

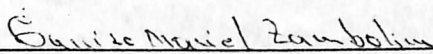
FRANCISCO MURILO ZERBINI JUNIOR

E. W. KITAJIMA
DEPT. BIOL. CEL - IB
UNIV. BRASÍLIA
70.910 - BRASÍLIA-DF
BRASIL

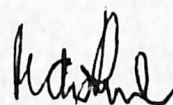
CARACTERÍSTICAS DE UM ISOLADO DO
VÍRUS DO MOSAICO DA COUVE-FLOR (CaMV)

Tese Apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como Parte das
Exigências do Curso de Fitopato-
logia, para Obtenção do Título de
"Magister Scientiae".

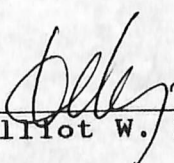
Aprovada: 27 de setembro de 1991



Pesq. Eunize Maciel Zambolim
(Conselheira)



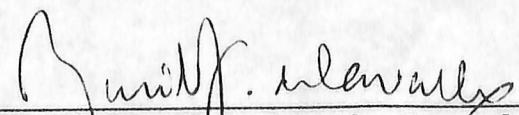
Prof. Maurílio Alves Moreira
(Conselheiro)



Prof. Elliot W. Kitajima



Prof. Acelino Couto Alfenas



Prof. Murilo Geraldo de Carvalho
(Orientador)

EXTRATO

ZERBINI Jr., FRANCISCO MURILO, M.S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 1992. *Características de um Isolado do Vírus do Mosaico da Couve-Flor (CaMV)*. Professor Orientador: Murilo Geraldo de Carvalho. Professores Conselheiros: Eunize Maciel Zambolim e Maurílio Alves Moreira.

Caracterizou-se, neste estudo, o vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) isolado a partir de plantas de couve-flor provenientes do Espírito Santo (isolado denominado CaMV-ES).

A caracterização biológica foi feita com base na gama de hospedeiros e transmissão por afídeos. O CaMV-ES infectou apenas plantas pertencentes a Cruciferae, produzindo clareamento de nervuras, mosaico internerval, deformação foliar e formação de bolhas, dependendo da espécie em questão. *Myzus persicae* transmitiu o CaMV-ES de forma semi-persistente.

O CaMV-ES foi purificado por meio de extração em tampão de fosfato, adição de uréia e Triton X-100, ultracentrifugação, ressuspensão dos "pellets" em tampão de fosfato e ultracentrifugação em gradiente de sacarose. Os

rendimentos obtidos foram da ordem de 10 mg/kg. Anti-soro contra o CaMV-ES foi produzido em coelhos e sensibilizado com látex.

As inclusões citoplasmáticas induzidas pelo CaMV-ES foram purificadas por meio de extração em tampão de fosfato, centrifugação em almofada de sacarose e adição de Triton X-100 e ultracentrifugação em gradiente de sacarose.

A proteína-matriz das inclusões citoplasmáticas e as proteínas capsidiais do vírus foram submetidas a SDS-PAGE. O peso molecular da proteína-matriz das inclusões foi estimado em 41 kD, e das proteínas capsidiais em 42 e 37 kD.

O DNA do CaMV-ES foi purificado por meio de digestão do capsídeo viral, remoção de proteínas com fenol/clorofórmio, precipitação com etanol, centrifugação e ressuspensão em tampão tris-borato. O DNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose, verificando-se possuir o mesmo aproximadamente 8000 pares de bases.

O estudo dos fragmentos obtidos após clivagem do DNA com Eco RI relaciona o CaMV-ES com isolados do CaMV provenientes da Itália. Os resultados obtidos após clivagem com Bam HI, Bgl II e Pvu II são insuficientes para permitir maiores considerações acerca do relacionamento do CaMV-ES com outros isolados do CaMV, embora indiquem ser distante o relacionamento com a estirpe típica do vírus.

ABSTRACT

ZERBINI Jr., FRANCISCO MURILO, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, april, 1992. *Characterization of an Isolate of Cauliflower Mosaic Virus (CaMV)*. Advisor: Murilo Geraldo de Carvalho. Committee Members: Eunize Maciel Zambolim e Maurílio Alves Moreira.

Cauliflower mosaic virus isolated from cauliflower plants, collected in the State of Espírito Santo, Brazil (isolate named CaMV-ES), was characterized.

Biological characterization was achieved by host range, symptomatology and aphid transmission studies. CaMV-ES was restricted to Cruciferae, causing vein clearing, vein banding and leaf distortion, depending on the infected plant species. *Myzus persicae* transmitted CaMV-ES in a semipersistent manner.

CaMV-ES was purified from mustard plants, by extraction with phosphate buffer, addition of urea and Triton X-100, ultracentrifugation, resuspension in phosphate buffer and rate zonal centrifugation in a sucrose gradient. The average yield of purified virus was 10 mg/kg. Antisera

against CaMV-ES were produced in rabbits. The antisera were latex-sensitized for using in the host range study.

The cytoplasmatic inclusion bodies induced by CaMV-ES were purified from mustard plants by extraction with phosphate buffer, centrifugation in a sucrose cushion after addition of Triton X-100, and rate zonal centrifugation in a sucrose gradient.

The inclusion bodies matrix protein and the viral capsid proteins were submitted to SDS-PAGE. Their molecular weights were found to be 41 kD for the matrix protein and 37 and 42 kD for the capsid proteins.

CaMV-ES DNA was purified by capsid digestion, phenol extraction and ethanol precipitation, followed by centrifugation and resuspension in tris-borate buffer. The DNA was found to be 8000 bases long by agarose gel electrophoresis.

Restriction mapping of the genome with Eco RI indicates that CaMV-ES is related to Italian isolates of the virus. Cleavage with Bam HI, Bgl II and Pvu II did not allow further inferences about the origin of CaMV-ES, although it makes possible to assume that there is only a distant relationship with the type strain.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O vírus do mosaico da couve-flor ("Cauliflower Mosaic Virus", CaMV) tem sido objeto de grande interesse por parte de pesquisadores no mundo inteiro (SHEPHERD, 1979a; HULL, 1984; HIRTH, 1986). Esse interesse verifica-se principalmente em razão das possibilidades de emprego do vírus como vetor de expressão de genes em plantas superiores (SHEPHERD, 1979b; GRONENBORN *et alii*, 1981; HIRTH, 1986; GRIERSON & COVEY, 1988; PFEIFFER & HOHN, 1989; BENFEY & CHUA, 1990; CLARK *et alii*, 1990), e em menor escala em razão da importância econômica da enfermidade causada pelo vírus, que raramente atinge nível de dano econômico para os agricultores (TOMPKINS, 1937; WALKER *et alii*, 1945; PIRONE *et alii*, 1961; TOKESHI & SALGADO, 1980; KERLAN & MEVEL, 1989).

O mosaico da couve-flor foi descrito por TOMPKINS, em 1937. Subsequentemente, WALKER *et alii* (1945) realizaram estudos minuciosos diferenciando e caracterizando os vírus capazes de infectar plantas de espécies da família

Cruciferae, entre os quais o CaMV. As partículas do vírus do mosaico da couve-flor são icosaédricas e seu "diâmetro" é de aproximadamente 50 nm (FUJISAWA *et alii*, 1967). O "peso molecular" da partícula é de $22 \pm 1,4 \times 10^6$ daltons, calculado a partir da equação de Svedberg. O ácido nucleico responde por 17% desse peso. O coeficiente de sedimentação do vírus ($S_{20,w}$) é de 208 S (SHEPHERD, 1979a).

O vírus do mosaico da couve-flor ocorre com freqüência considerável nas regiões de clima temperado do mundo inteiro, tendo sido relatado na América do Norte, Europa, União Soviética e Argentina (SHEPHERD, 1981).

Foi pequeno o interesse em relação ao vírus do mosaico da couve-flor, até que, em 1968, SHEPHERD *et alii* verificaram que seu genoma era constituído de DNA de fita dupla (dsDNA), ao contrário de todos os outros vírus de plantas até então conhecidos, com genoma composto por RNA. A partir de então, o CaMV, e alguns outros vírus de DNA relacionados, passaram a ser intensamente estudados. Esses estudos foram motivados pelo interesse científico e o uso potencial desses vírus como vetores de genes em plantas. O grupo Caulimovírus foi criado para englobar vírus com dsDNA, incluindo o CaMV, como membro tipo, o vírus do mosaico da dália (DaMV), da faixa das nervuras do morangueiro (SBVB), e outros. Além do genoma de ds-DNA, todos os Caulimovírus possuem partículas isométricas com aproximadamente 50 nm de diâmetro, induzem a formação de inclusões citoplasmáticas em células infectadas, possuem gamas de hospedeiros reduzidas e são transmitidos por afídeos de maneira não-persistente ou

semi-persistente (HARRISON *et alii*, 1971; MATTHEWS, 1981; HULL, 1984).

O emprego do CaMV como vetor de expressão genes é objetivo final proposto pela maioria dos estudos envolvendo o vírus (HOWELL *et alii*, 1980; HIRTH, 1986; PFEIFFER & HOHN, 1989; BEACHY *et alii*, 1990; BATTRAW & HALL, 1990; BENFEY & CHUA, 1990; COOKE & PENON, 1990).

Embora outros elementos genéticos também possam ser empregados como vetores, o CaMV apresenta vantagens importantes: seu genoma, de pequeno tamanho e do mesmo tipo que o genoma da planta (DNA de fita dupla), pode ser facilmente manipulado e modificado, e ainda assim ter seus genes expressos nas células vegetais (SZETO *et alii*, 1977; SHEPHERD, 1979a; HOWELL *et alii*, 1980). Entretanto, GRONENBORN *et alii* (1981) demonstraram ser possível inserir fragmentos de, no máximo, 250 pares de bases no genoma do CaMV sem perda da infectividade da partícula viral. A limitação no número de bases provavelmente é devida a problemas na montagem da partícula, pois ocorre uma interação muito forte entre o DNA e o capsídeo. Essa limitação, somada ao fato do genoma do CaMV não ser incorporado ao genoma da célula hospedeira, tem inviabilizado, até o presente, o uso do genoma intacto do vírus como um vetor (HIRTH, 1986; GRIERSON & COVEY, 1988).

Uma alternativa mais promissora ao uso do genoma do vírus é o aproveitamento de algumas seqüências específicas, particularmente a região correspondente ao promotor do RNA 35S, para a construção de vetores quiméricos, que normalmente possuem também segmentos de DNA provenientes do

plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. O papel da seqüência pertencente ao CaMV é promover a expressão do gene, cabendo à porção de origem bacteriana o transporte e incorporação do gene à célula hospedeira (BEACHY *et alii*, 1990). Além de permitir a inserção de segmentos maiores de DNA, esse tipo de vetor não está restrito à gama de hospedeiros do CaMV, bastante reduzida. BEACHY *et alii* (1990) listaram os casos até hoje relatados de êxito com o uso de vetores quiméricos contendo o promotor 35S do CaMV, com o objetivo de produzir plantas resistentes a vírus através da incorporação do gene da capa protéica dos vírus. Entre os casos relatados incluem-se as culturas da batata (PVX, PVY), tomate (TMV, ToMV, AlMV), fumo (TMV, ToMV, ORSV, TRV, TSV, TEV, PVX, PVY e PEBV) e alfafa (AlMV).

No Brasil, o vírus foi isolado por KITAJIMA & COSTA, em 1965. Embora os autores afirmassem na época tratar-se de um vírus "relacionado ao vírus do mosaico da couve-flor", as características morfológicas das partículas e das inclusões citoplasmáticas, os sintomas observados nas plantas infectadas e o modo de transmissão do vírus teriam sido suficientes para afirmar que se tratava realmente do CaMV. Após essa primeira descrição, a presença do CaMV foi relatada esporadicamente em algumas regiões do país, mas nenhum estudo detalhado a respeito do vírus foi levado a termo (NOGUEIRA & SILVA, 1985; CUPERTINO *et alii*, 1986).

Recentemente, o vírus do mosaico da couve-flor foi identificado no Laboratório de Virologia Vegetal da U.F.V., em material procedente de hortas comerciais do estado do Espírito Santo. Embora o CaMV normalmente não cause

prejuízos à cultura, a incidência e severidade da doença na região tem sido bastante elevadas, havendo casos de perda total da produção em algumas propriedades (Ventura, J.A., 1991, Inf. pessoal). O bom conhecimento do agente etiológico é condição essencial para que sejam adotadas medidas de controle adequadas.

Um estudo detalhado a respeito desse isolado do vírus do mosaico da couve-flor pode significar, também, um avanço potencial na direção do melhoramento de culturas de interesse nacional a partir de técnicas biotecnológicas, em programas envolvendo a incorporação de genes em variedades comerciais, a fim de conferir resistência a pragas e doenças ou incorporar características agronômicas desejáveis a essas culturas.

O principal objetivo deste trabalho foi caracterizar, ao nível molecular, esse isolado do vírus do mosaico da couve-flor, comparando-o com isolados estudados em outros países de modo a evidenciar semelhanças e eventuais diferenças. Daí poderão surgir informações que permitam o controle adequado da doença nos locais onde esta se manifesta. O trabalho foi dividido em três partes: (1) caracterização biológica do vírus, envolvendo gama de hospedeiros, sintomatologia e transmissão por vetores; (2) purificação do vírus e de suas inclusões citoplasmáticas, e caracterização das proteínas estruturais de ambos e (3) caracterização do ácido nucleico viral.

CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DO ISOLADO DO CaMV

1. INTRODUÇÃO

Os membros do grupo Caulimovírus possuem gamas de hospedeiros bastante restritas (BRUNT, 1971; SHEPHERD, 1979b; HULL, 1984; MEVEL e KERLAN, 1990). Apenas membros da família Cruciferae são infectados naturalmente pelo vírus do mosaico da couve-flor. Entre os hospedeiros, encontram-se a couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.), nabo (*B. rapa* L.), mostarda (*B. juncea* (L.) Czerniak), repolho (*B. oleracea* var. *capitata* L.) e outras. Por meio de inoculação mecânica, verifica-se que alguns isolados do CaMV podem infectar espécies de Solanaceae, como *Datura stramonium* L., *Nicotiana clevelandii* L., *N. edwardsonii* L. e *N. bigelovii* L.. A capacidade de infectar ou não esses hospedeiros e o tipo de sintoma em cada um são características de diferentes isolados do vírus do mosaico

da couve-flor (LUNG e PIRONE, 1972; SCHOELZ *et alii*, 1986b; SCHOELZ e SHEPHERD, 1988; MEVEL e KERLAN, 1990).

Os sintomas de infecção da couve-flor pelo CaMV consistem em um forte clareamento de nervuras nas folhas mais novas, o qual gradualmente vai sendo substituído por mosaico internerval (TOMPKINS, 1937; WALKER *et alii*, 1945; SHEPHERD, 1981; KERLAN e MEVEL, 1989). A planta tem seu crescimento reduzido e a formação de cabeças é prejudicada. Em algumas variedades de couve-flor pode ocorrer apenas um ligeiro clareamento de nervuras e mesmo esse sintoma pode desaparecer em temperaturas mais elevadas (SHEPHERD, 1981). A temperatura ideal para a multiplicação do vírus situa-se em torno de 20°C. A multiplicação do vírus cessa a 33°C, mas é reiniciada se a temperatura cai para 20°C (YAMAOKA *et alii*, 1982).

Em outros hospedeiros, o vírus geralmente provoca mosqueado clorótico ou mosaico. A intensidade dos sintomas varia com o isolado, podendo alguns isolados mais virulentos causar a morte das plantas (WALKER *et alii*, 1945; SHEPHERD, 1981). O nabo (*Brassica rapa*) é empregado como diferenciador de isolados do CaMV na Europa e na América do Norte. A cultivar "Just Right" responde com lesões locais à infecção pelo vírus (SHEPHERD, 1981).

O CaMV é transmitido naturalmente por, no mínimo, 27 espécies de afídeos, entre os quais *Brevicorine brassicae* L., inseto comumente encontrado em cultivos de brássicas, *Myzus persicae* Sulz. e *Aphis gossipii* L., afídeos que transmitem muitos outros fitovírus, (CHALFANT e CHAPMAN, 1962; SHEPHERD, 1981). CHALFANT e CHAPMAN (1962), estudando

o relacionamento vírus-vetor, verificaram que *Myzus persicae* transmite o CaMV de forma não-persistente, uma vez adquirido o vírus, após um a cinco minutos de alimentação na planta infectada. O período de retenção é de 24 horas, em média. Já *B. brassicae* transmite o CaMV de forma não-persistente ou semi-persistente, se o período de aquisição for curto ou longo, respectivamente (transmissão bimodal). O período de retenção do CaMV neste afídeo é longo, crescendo com o aumento do período de aquisição (CHALFANT e CHAPMAN, 1962).

Hamlym, citado por SHEPHERD (1981), relatou que a eficiência na transmissão do vírus por *Myzus persicae* não foi afetada pelo comportamento do inseto antes ou após o acesso de aquisição.

Alguns isolados do CaMV não são transmitidos por afídeos, em virtude da perda de uma região do genoma viral responsável pela síntese de uma proteína essencial para a aquisição do vírus pelos insetos (LUNG e PIRONE, 1973; ARMOUR *et alii*, 1983).

O vírus não é transmitido pelas sementes de brássicas (TOMPKINS, 1937; SHEPHERD, 1981; HULL, 1984). Dessa forma, sua disseminação a longas distâncias está restrita pela movimentação do inseto vetor, sabidamente limitada, e à ação do homem, na forma de manuseio, transporte e/ou intercâmbio de mudas de brássicas.

Essa parte do trabalho teve como objetivos verificar a gama de hospedeiros desse isolado do CaMV, os sintomas provocados pela infecção viral nos hospedeiros e o modo de transmissão do vírus por insetos vetores. Não foi pretendido um estudo amplo de comprovação de hospedeiros, mas

principalmente, a verificação dos sintomas surgidos em hospedeiros reconhecidos do vírus, de modo a realçar as semelhanças e diferenças entre este e os demais isolados e estirpes do CaMV descritos até o presente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Fonte do Isolado Viral

O isolado do CaMV empregado neste estudo é proveniente de plantas de couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), cultivar Teresópolis Gigante, apresentando sintomas de mosaico, clorose internerval e acentuado subcrescimento, coletadas em um plantio comercial no município de Venda Nova do Imigrante (ES).

Essas plantas foram testadas para infecção pelo CaMV, sendo a identidade viral comprovada por meio de observação de inclusões citoplasmáticas aos microscópios ótico e eletrônico (Cap. II, item 3.2.1.), morfologia de partículas ao microscópio eletrônico e transmissão do vírus para plantas de couve-flor e mostarda (*Brassica juncea*), obtendo-se os mesmos sintomas e sinais da doença. Esse isolado do CaMV será daqui em diante denominado CaMV-ES.

2.2. *Preservação in vivo e in vitro do Isolado*

O vírus, inicialmente encontrado em plantas de couve-flor, foi transmitido via extrato foliar, tamponado em fosfato de potássio 0,2 M pH 7,2, e por meio de afídeos para plantas de mostarda e couve-flor, mantidas em casa-de-vegetação. Empregou-se *Myzus persicae* como vetor.

A manutenção *in vivo* do isolado foi feita em plantas de mostarda, mantidas em câmaras-de-crescimento reguladas para 18°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 6000 lux. A transmissão foi feita por meio de afídeos, sempre empregando-se *Myzus persicae* como vetor. Os afídeos foram submetidos a jejum pré-aquisição de duas horas, permaneceram cinco minutos sobre folhas infectadas e foram transferidos para plantas sadias de mostarda, onde permaneceram por 24 a 48 horas. A eliminação dos insetos foi feita mediante aplicação de inseticida (Malatol 50E a 0,3 ml/l ou Decis CE25 a 0,15 ml/l).

Para a manutenção *in vitro*, folhas de mostarda com sintomas típicos da virose foram cortadas finamente e dessecadas a 4°C. Posteriormente, foram transferidas para pequenos frascos contendo sílica-gel, e estes mantidos a -20°C. O material dessecado foi empregado periodicamente como fonte recorrente do vírus, com o fim de garantir a pureza biológica nas multiplicações do agente etiológico.

2.3. *Gama Parcial de Hospedeiros*

Com base em dados da bibliografia (WALKER *et alii*, 1945; MEVEL e KERLAN, 1990), as seguintes espécies vegetais

foram empregadas no teste de gama de hospedeiros: *Brassica oleracea* var. *botrytis* (couve-flor), *B. oleracea* var. *capitata* (repolho), *B. oleracea* var. *acephala* L. (couve-de-folha), *B. oleracea* var. *italica* L. (brócolis), *B. rapa* (nabo), *B. chinensis* L. (couve chinesa) e *B. juncea* (mostarda de folha), pertencentes à família Cruciferae; *Chenopodium quinoa* L. e *Chenopodium amaranticolor* Coste & Rein, pertencentes à Chenopodiaceae; *Datura stramonium*, *Nicotiana tabacum* L., *N. silvestris* L., *N. clevelandii*, *N. glutinosa* L. e *Lycopersicon esculentum* Mill. (tomateiro), pertencentes à Solanaceae; e *Gomphrena globosa* L., pertencente à Amaranthaceae.

A semeadura foi realizada em leito de areia. As plântulas foram transplantadas para vasos contendo 500 g de mistura 3-1-1 de solo, esterco e areia, mantidas em telado até o tamanho ideal para a inoculação (duas a três folhas definitivas), realizada por meio de afídeos, da forma descrita no item 2.2 deste Capítulo. Após 24 horas foram reinoculadas mecanicamente, usando-se folhas infectadas na presença de tampão de fosfato 0,05 M pH 7,2 contendo sulfito de sódio 0,1 M, a frio. Foram então transferidas para câmara-de-crescimento regulada para 18°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 6000 lux, onde permaneceram por até cinco semanas. Ao final desse período, procedeu-se a avaliação visual dos sintomas.

Plantas que permaneceram assintomáticas foram testadas para infecção latente pelo CaMV-ES através do teste de aglutinação em látex (FRIBOURG e NAKASHIMA, 1984). Para o teste, 20 µl de extrato foliar, em diluições 1:10 e 1:50 em

tris-HCl 0,05 M pH 8,0, contendo sulfito de sódio 0,01 M e Tween-20 a 0,05% (v/v), foram depositados sobre placas de poliestireno e misturados a 20 µl de suspensão de imunoglobulina sensibilizada, preparada conforme descrito no item 2.2 do Capítulo II. As placas foram mantidas sob agitação lenta por uma hora em agitador orbital, e os resultados avaliados visualmente. Para cada espécie empregada no teste foram realizados testes com quatro folhas, com duas repetições por folha.

2.4. Transmissão por Vetores

Com a finalidade de estudar aspectos da transmissão do CaMV-ES por afídeos, três experimentos foram realizados. Nos três casos, plantas de mostarda (*Brassica juncea*) foram utilizadas como hospedeiros e o afídeo *Myzus persicae* como vetor. A semeadura, o transplântio e a manutenção das plantas durante os experimentos foram realizados conforme descrito no item 2.3 deste Capítulo. As colônias de afídeos foram mantidas em plantas sadias de pimentão e os insetos coletados quando necessário.

2.4.1. Efeito de Jejum Durante o Período Pré-Aquisição

A fim de verificar se o jejum dos afídeos durante o período pré-aquisição tem influência sobre a eficiência de transmissão do CaMV-ES, afídeos foram submetidos a jejum por zero, meia, uma, duas e seis horas. Em seguida, foram transferidos para folhas de mostarda infectadas pelo vírus.

O período de aquisição permitido foi de cinco minutos. Foram transferidos dois afídeos para cada planta sadia de mostarda. Após 24 horas, os insetos foram eliminados com a aplicação de Malatol 50E a 0,3 ml/l.

Cada tratamento consistiu em 15 plantas, com duas repetições, num total de 30 plantas por tratamento. O controle consistiu em plantas nas quais foram depositados afídeos que não se alimentaram em folhas infectadas. A avaliação foi realizada vinte e cinco dias após a inoculação, verificando-se visualmente quais plantas apresentavam sintomas da infecção pelo CaMV. Os dados foram expressos na forma de porcentagem de plantas doentes, para cada tratamento.

2.4.2. Período de Aquisição

Nas associações vírus-vetor do tipo não persistente, o vírus é adquirido pelo inseto quase imediatamente após este iniciar a alimentação em plantas infectadas e períodos de aquisição maiores do que cinco minutos costumam levar a um decréscimo na eficiência de transmissão. Isso foi verificado, com *Myzus persicae*, para a maioria dos isolados do vírus do mosaico da couve-flor até hoje estudados.

A fim de estimar o período mínimo de aquisição para o CaMV-ES e como pode ser afetada a transmissão do vírus por *Myzus persicae* ao se alongar esse período, afídeos submetidos a jejum por seis horas alimentaram-se por 15 segundos, um, dois ou cinco minutos em plantas de mostarda infectadas pelo vírus, antes de serem transferidos para

plantas sadias. Após 24 horas, foram eliminados com aplicação de Decis CE25 a 0,15 ml/l.

Foram utilizadas 15 plantas por tratamento, com duas repetições, com a deposição de dois afídeos em cada planta sadia. As condições de crescimento das plantas e avaliação dos resultados foram as mesmas descritas no item 2.4.1 deste Capítulo.

2.4.3. Período de Retenção

O período de retenção é o tempo máximo durante o qual o espécime de afídeo, uma vez virulífero, permanece capaz de transmitir o vírus para plantas sadias sem alimentar-se em plantas infectadas. No caso do CaMV, esse período dura de 12 a 72 horas (CHALFANT e CHAPMAN, 1962).

A fim de avaliar o período de retenção do CaMV-ES, afídeos virulíferos foram depositados em plantas sadias (dois insetos por planta), onde permaneceram por três horas. Em seguida, foram transferidos para novas plantas sadias, onde permaneceram por nove horas, repetindo-se esse procedimento de 12 em 12 horas, até que se somaram 72 horas de retenção, valor máximo relatado para o CaMV na bibliografia. Dessa forma, os tratamentos consistiram em períodos de retenção de zero, três, 12, 24, 48 e 72 horas, com cinco plantas por tratamento e adotando-se duas repetições, para um total de 10 plantas por tratamento.

As condições de crescimento das plantas e avaliação dos resultados foram as mesmas descritas para o item 2.4.1 deste Capítulo.

3. RESULTADOS

A gama de hospedeiros do CaMV-ES mostrou-se bastante restrita. Apenas membros da família Cruciferae foram infectados pelo vírus (Quadro 1). Foi grande o contraste entre as reações positiva e negativa, no teste de aglutinação em látex, o que facilitou a constatação de infecções latentes.

Os resultados dos experimentos com afídeos indicam ser do tipo semi-persistente a transmissão do CaMV-ES por *M. persicae*. Um período de aquisição de 15 segundos foi suficiente para que o afídeo transmitisse o vírus para plantas de mostarda (Figura 1). O período de retenção estendeu-se por até 72 horas, tempo máximo testado (Figura 2). O jejum dos afídeos durante o período imediatamente anterior ao acesso de aquisição parece favorecer a transmissão do vírus (Figura 3).

QUADRO 1 - Alterações Verificadas nas Espécies e Variedades de Plantas Inoculadas com o CaMV-ES

Espécie/Variedade ¹	Sintomas Macroscópicos ²	Infecção Latente ³
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	cn, dfo, mi, rç	-
<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	-	+
<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>	cn, dfo, mb, rç	-
<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i>	cn, nq	-
<i>B. rapa</i>	cn, mi, rç	-
<i>B. chinensis</i>	-	-
<i>B. juncea</i>	cn, dfo, ep, mi, nn, nt	-
<i>Chenopodium quinoa</i>	-	-
<i>C. amaranticolor</i>	-	-
<i>Datura stramonium</i>	-	-
<i>Nicotiana tabacum</i>	-	-
<i>N. silvestris</i>	-	-
<i>N. clevelandii</i>	-	-
<i>N. glutinosa</i>	-	-
<i>Lycopersicon esculentum</i>	-	-
<i>Gomphrena globosa</i>	-	-

1. Plantas inoculadas por meio de afídeos, submetidos a jejum por seis horas e com período de aquisição de cinco minutos. Reinoculadas mecanicamente, via extrato foliar tamponado em fosfato 0,2 M pH 7,2 contendo sulfato de sódio, a frio.

2. Os sintomas constatados foram simbolizados: cn, clareamento de nervuras; dfo, deformação foliar; ep, epinastia; ms, mosaico; mb, mosaico com bolhas; mi, mosaico internerval; nq, mosqueado; nt, morte de plantas; nn, necrose de nervuras; rç, redução de crescimento; -, sem sintomas perceptíveis

3. Comprovada pelo teste de aglutinação em látex, realizado conforme descrito em Material e Métodos, 45 dias após a inoculação. As folhas empregadas no teste foram colhidas 30 dias após a inoculação e mantidas a -20°C até a realização do teste.

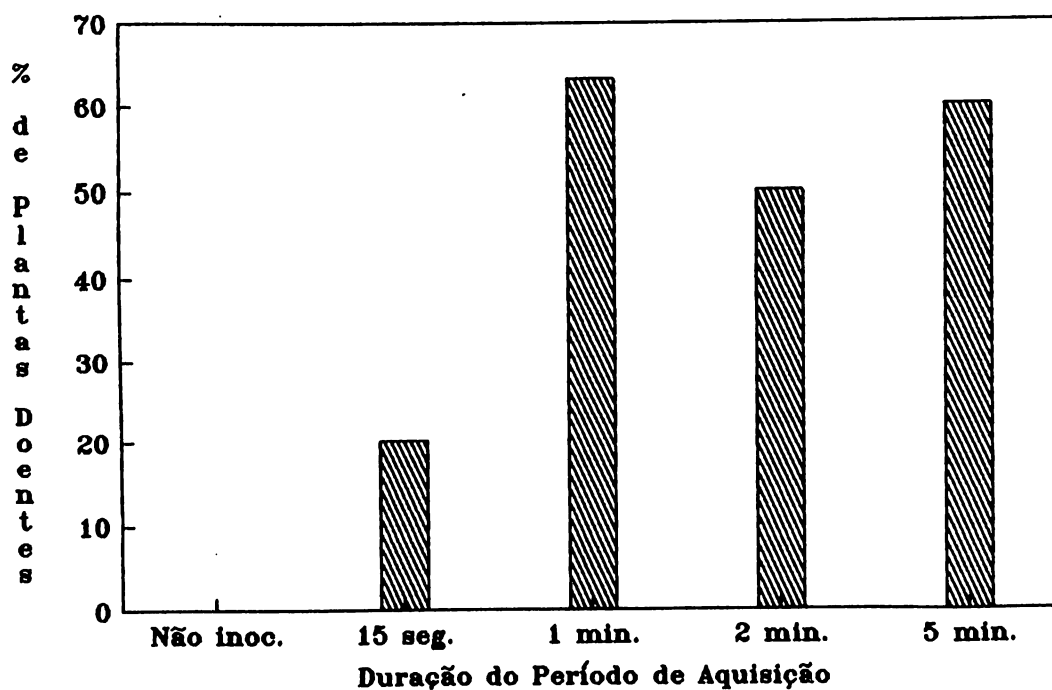


FIGURA 1 - Transmissão do CaMV-ES por *Myzus persicae*, Expressa em Porcentagens de Plantas de Mostarda (*Brassica juncea*) Infectadas pelo Vírus de Acordo com a Duração do Período de Aquisição (Média de Duas Repetições).

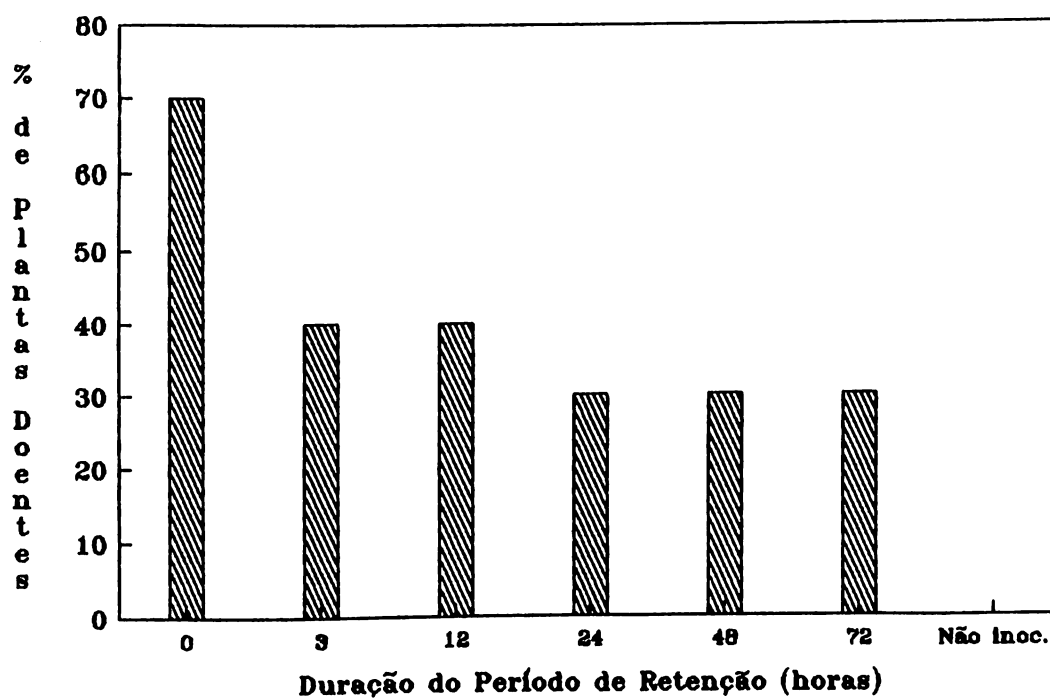


FIGURA 2 - Transmissão do CaMV-ES por *Myzus persicae*, Expressa em Porcentagens de Plantas de Mostarda (*Brassica juncea*) Infectadas pelo Vírus de Acordo com a Duração do Período de Retenção (Média de Duas Repetições).

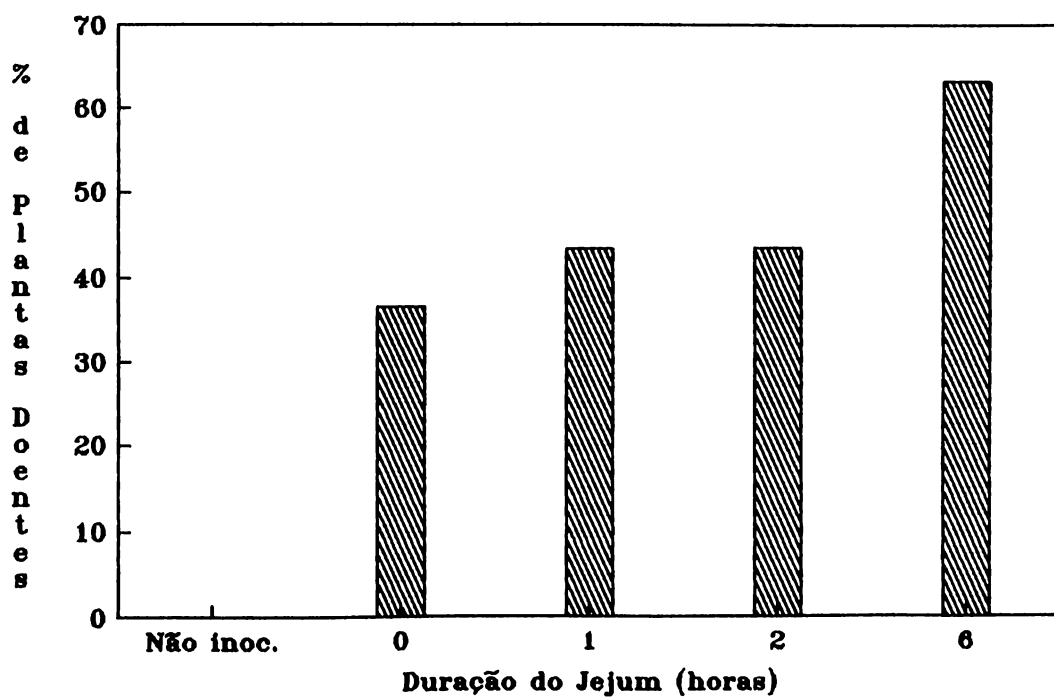


FIGURA 3 - Transmissão do CaMV-ES por *Myzus persicae*, Expressa em Porcentagens de Plantas de Mostarda (*Brassica juncea*) Infectadas pelo Vírus de Acordo com a Duração do Período de Jejum dos Afídeos Durante o Período de Pré-Aquisição (Média de Duas Repetições).

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho, o teste de gama de hospedeiros foi realizado de forma a verificar se o CaMV-ES é capaz de infectar algumas espécies não pertencentes à família Cruciferae e que tenham sido relatadas como hospedeiras de outros isolados do CaMV. Estas incluem, basicamente, espécies pertencentes à família Solanaceae. A presença de *Chenopodium quinoa* e *C. amaranticolor* na gama de hospedeiros teve como finalidade assegurar a pureza biológica do isolado, visto que é comum a infecção mista de couve-flor pelo CaMV e pelo vírus do mosaico do nabo (TuMV). Apenas este último é capaz de infectar Chenopodiaceae, e a ausência de sintomas verificada nas espécies citadas desta família confirmou a pureza do isolado do CaMV em estudo.

Conforme relatado por diversos autores (LUNG e PIRONE, 1972; SCHOELZ e SHEPHERD, 1988; KERLAN e MEVEL, 1989; MEVEL e KERLAN, 1990), vários isolados do CaMV são capazes de infectar *Datura stramonium* e/ou *Nicotiana clevelandii*. Oito entre treze isolados testados por MEVEL e

KERLAN (1990) infectaram sistemicamente *D. stramonium*, aqui incluídos dois isolados provenientes da Argentina. Estes últimos também infectaram *N. clevelandii*, produzindo manchas necróticas em folhas não inoculadas. Todos os isolados testados por esses autores infectaram ao menos uma espécie pertencente a Solanaceae.

DAUBERT e ROUTH (1990) dividem os isolados do CaMV entre aqueles capazes de infectar sistemicamente *D. stramonium* e aqueles que não infectam essa espécie, podendo ou não induzir pequenas lesões no local de inoculação. Já SCHOELZ e SHEPHERD (1988) dividem os isolados do CaMV em quatro grupos, de acordo com a capacidade de infectarem *D. stramonium*, *N. clevelandii*, *N. bigelowii* e *N. edwardsonii*.

Embora não tenha sido possível testar essas duas últimas espécies como hospedeiras do CaMV-ES, a consistência dos resultados obtidos permite concluir que este isolado do vírus realmente está restrito a Cruciferae. Por diversas vezes o CaMV-ES foi inoculado, mecanicamente ou por afídeos, em *Datura stramonium* e *N. clevelandii*, com ausência de sintomas. Nem mesmo pequenos pontos necróticos no local de inoculação, sintoma relatado por DAUBERT e ROUTH (1990), foram encontrados.

A suscetibilidade de espécies de *Brassica* também varia de acordo com o isolado do CaMV em questão. Segundo SAUNDERS *et alii* (1990), essa suscetibilidade está relacionada com etapas específicas da multiplicação do vírus.

Brassica juncea (mostarda) mostrou-se a espécie mais suscetível ao CaMV-ES. *Brassica oleracea* e *Brassica rapa* (nabo) apresentaram suscetibilidade intermediária, embora *B.*

oleracea var. *capitata* (repolho) tenha apresentado apenas infecção latente. *B. chinensis* (couve-chinesa) não foi infectada. Plantas de mostarda infectadas tornaram-se raquíticas e as folhas novas praticamente não se desenvolveram. Foi comum a morte de plantas, entre 10 a 15 dias após o surgimento dos primeiros sintomas. Esses resultados divergem daqueles obtidos por SAUNDERS *et alii* (1990) para a estirpe Cabb B-JI do CaMV. Com relação a essa estirpe, *B. rapa* foi a espécie mais suscetível, *B. juncea* apresentou suscetibilidade intermediária e *B. oleracea* foi a menos suscetível. A estirpe Cabb B-JI, derivada da estirpe Cabb B, que vem sendo multiplicada na Califórnia desde 1945, é considerada a estirpe típica do vírus (SHEPHERD, 1981).

Por fim, é conveniente observar que mesmo dentro de cada espécie e subespécie hospedeira do CaMV, ocorrem diferenças ao se considerarem diferentes cultivares. Assim, SAUNDERS *et alii* (1990) encontraram, para a estirpe Cabb B-JI, diferentes níveis de suscetibilidade dentro da espécie *B. juncea*, alta na cultivar 'Tsunga 4291' e baixa na cultivar '3109'. O CaMV-ES foi isolado a partir da cultivar de couve-flor 'Teresópolis Gigante', mas no teste de gama de hospedeiros foi empregada a cultivar 'Piracicaba Precoce'. Isso poderia explicar a alta severidade verificada no campo (VENTURA, 1991) e a baixa severidade verificada nas plantas testadas.

A transmissão do CaMV-ES por *Myzus persicae* de e para plantas de mostarda mostrou características intermediárias entre o tipo não-persistente (o muito curto período de aquisição, a imediata transmissão do vírus pelos

de cinco minutos). A influência de jejum na eficiência de transmissão não foi investigada pelos autores. Além disso, os afídeos transmitiram o CaMV com considerável frequência (10% das plantas inoculadas) mesmo quando o período de aquisição se estendeu por cinco horas. A porcentagem de plantas infectadas foi sempre baixa, em todos os tratamentos, nunca ultrapassando 25% das plantas inoculadas. Portanto, com base nos conceitos atuais de transmissão não-persistente, semipersistente e persistente (MATTHEWS, 1991), seria pouco prudente afirmar que uma transmissão com essas características seja do tipo não-persistente.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente estudo teve como objetivo a caracterização biológica de um isolado do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) proveniente do estado do Espírito Santo (CaMV-ES). As características estudadas foram a gama de hospedeiros e a transmissão por vetores, nesse caso verificando-se a influência do jejum pré-aquisição na transmissão do vírus e os valores estimados para o período de aquisição e o período de retenção. O afídeo *Myzus persicae* foi empregado como vetor, e plantas de mostarda (*Brassica juncea*) como o hospedeiro viral.

Apenas espécies pertencentes a Cruciferae foram infectadas pelo CaMV-ES. Nessas espécies, de modo geral, o vírus produziu inicialmente clareamento de nervuras, seguido por mosaico internerval, deformação foliar e formação de bolhas, dependendo da espécie em questão. Os sintomas foram mais intensos em *B. juncea*, sendo comum a morte de plantas, e em *B. chinensis* foi verificada apenas infecção latente. Espécies pertencentes a Solanaceae, eventualmente infectadas

por outros isolados do CaMV, não foram infectadas pelo CaMV-ES.

Myzus persicae transmitiu o CaMV-ES de forma semipersistente. Um período de aquisição de 15 segundos foi suficiente para a transmissão, realizada imediatamente após a aquisição. O período de retenção estendeu-se por três dias, tempo máximo testado.

CAPÍTULO II

PURIFICAÇÃO DO VÍRUS, PRODUÇÃO DE ANTI-SORO, CARACTERIZAÇÃO DAS INCLUSÕES CITOPLASMÁTICAS E DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DA PROTEÍNA CAPSIDIAL

1. INTRODUÇÃO

A purificação de um vírus é ponto de partida para uma série de estudos. A partir da preparação viral purificada é possível isolar a proteína capsidial e o ácido nucleico virais. Características físico-químicas de um vírus são determinadas a partir de preparações purificadas. A produção de anti-soros com alta especificidade e bom título é assegurada caso seja possível obter um alto grau de pureza da preparação viral. A ausência de contaminantes provenientes do hospedeiro é importante para que não ocorram reações inespecíficas nos testes sorológicos.

O vírus do mosaico da couve-flor, bem como outros Caulimovírus, induz a formação de inclusões citoplasmáticas, também denominadas "corpos-X" ou "viroplasmas", em células foliares infectadas (FUJISAWA *et alii*, 1967; KITAJIMA *et*

alii, 1969; SHALLA *et alii*, 1980; SHEPHERD *et alii*, 1980; SHEPHERD, 1981; HULL, 1984). Essas inclusões são visíveis ao microscópio ótico, depois de se retirar a epiderme foliar e em seguida mantê-la por uma hora em floxina a 1%, com a remoção do excesso de corante. As inclusões são vistas como corpos ovóide-alongados, de cinco a 20 μm de "diâmetro". Normalmente, observa-se apenas uma ou duas inclusões por célula (MARTELLI e CASTELLANO, 1971; SHALLA *et alii*, 1980; HULL, 1984).

Quando observadas ao microscópio eletrônico, as inclusões são vistas como u'a massa eletrodensa, constituída basicamente de uma matriz proteica granular, desprovida de membranas, podendo ou não possuir vacúolos no interior dos quais se encontram partículas virais (FUJISAWA *et alii*, 1967; CONTI *et alii*, 1972; SHALLA *et alii*, 1980). Outro tipo de inclusão, sem vacúolos e sem a presença de partículas virais, também pode ser observada, embora em menor número (SHALLA *et alii*, 1980).

Pelo menos um isolado do CaMV induz a formação de inclusões no interior de cloroplastos, embora sem a presença de partículas virais (SHALLA *et alii*, 1980).

As inclusões são normalmente cercadas de ribossomos, caracterizando intensa síntese proteica (HULL, 1984). A proteína-matriz das inclusões é codificada pelo vírus, e seu peso molecular é de 55 kD (SHOCKEY *et alii*, 1980; SHEPHERD, 1981; HULL, 1984).

A proteína capsidial do vírus do mosaico da couve-flor pode ser isolada por cromatografia (SHEPHERD, 1981). Estimativas iniciais de seu peso molecular mediante

eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE), realizadas por diferentes autores, levaram a resultados discrepantes, com várias bandas ocorrendo em um mesmo gel e com pesos moleculares variados (TEZUKA e TANIGUCHI, 1972b; BRUNT *et alii*, 1975). Atualmente, aceita-se que o capsídeo do CaMV é constituído por duas proteínas, com pesos moleculares de 37 e 42 kD, havendo um precursor único, com peso molecular de 57 kD, que não participa da partícula viral (HULL e SHEPHERD, 1976; AL-ANI *et alii*, 1979; HAHN e SHEPHERD, 1980; HULL, 1984; HIRTH, 1986; KRUSE *et alii*, 1987).

Os objetivos desta segunda parte do trabalho foram:

- (a) purificar o vírus do mosaico da couve-flor, procurando obter uma preparação o mais livre possível de contaminantes;
- (b) produzir anti-soro contra o vírus, com alta especificidade e bom título;
- (c) sensibilizar o IgG com látex e preparar o teste diagnóstico correspondente;
- (d) purificar as inclusões citoplasmáticas induzidas pelo vírus e caracterizá-las morfológicamente;
- (e) determinar o peso molecular da proteína-matriz das inclusões citoplasmáticas;
- (f) determinar o(s) peso(s) molecular(es) do(s) polipeptídeo(s) que compõe(m) o capsídeo viral.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Purificação do Vírus e Produção de Anti-Soro

2.1.1. Multiplicação do Vírus e Método de Purificação

O CaMV-ES foi multiplicado em plantas de mostarda. A inoculação e a manutenção das plantas foram realizadas conforme descrito no item 2.2 do Capítulo I.

O vírus foi purificado de acordo com método descrito por HULL *et alii* (1976), com algumas modificações. O extrato foliar e as soluções foram mantidas a frio (dois a 10°C), em todas as etapas. Folhas de mostarda apresentando sintomas da virose, 25 dias após a inoculação, foram trituradas em liquidificador, na presença de tampão de fosfato de potássio 0,2 M, pH 7,2, contendo sulfito de sódio 0,06 M, 2-mercaptoetanol 0,09 M e EDTA 0,02 M, na proporção de 700 ml de tampão para cada 1000 g de folhas. O extrato foi filtrado em gaze dupla previamente fervida em água por 10 minutos, seguindo-se adição de uréia para uma concentração 1 M e

Triton X-100 para 2,5% (v/v). O extrato foi mantido sob agitação lenta por uma noite e então centrifugado a 2500 g por 10 minutos. O sobrenadante foi ultracentrifugado a 63500 g por 90 minutos. Os sedimentos foram ressuspensos em tampão de fosfato de potássio 0,05 M pH 7,2, contendo uréia 1 M, triton X-100 2,0% (v/v), EDTA 0,01 M, sulfito de sódio 0,03 M e 2-mercaptoetanol 0,05 M, na proporção de 50 ml de tampão para 1000 ml de extrato inicial. Após repouso por 15 horas o material foi centrifugado a 3800 g por 10 minutos. O sobrenadante foi então submetido à ultracentrifugação zonal em gradiente de sacarose 10-40%, a 54000 g por duas horas. O gradiente foi formado pela sobreposição, respectivamente, de 0,9, 0,9, 0,9 e 0,6 ml de solução de sacarose 40, 30, 20 e 10% (p/v) em tampão de ressuspensão. A banda viral foi recolhida com auxílio de seringa e diluída em água destilada, na proporção 1:3, seguindo-se ultracentrifugação a 125000 g por uma hora. Os sedimentos foram ressuspensos em água destilada. Essa suspensão, consistindo na preparação final purificada, foi armazenada a -20°C .

2.1.2. Avaliação da Qualidade e Rendimento do Vírus Purificado

Foram utilizados dois métodos para a avaliação quantitativa e qualitativa das preparações purificadas do CaMV-ES: micrografias eletrônicas das preparações e seu espectro de absorção na faixa de comprimentos de onda UV, parcialmente corrigido para dispersão ótica. O valor do coeficiente de extinção, $E_{260}^{0,1\%}$, para o CaMV, é de 4,36

(SHEPHERD, 1979b). Posteriormente, a ausência de contaminantes foi confirmada pela não ocorrência de reações inespecíficas no teste de aglutinação em látex (itens 2.2 deste Capítulo e 2.3 do Capítulo I).

2.1.3. Produção de Anti-Soro

Os anti-soros contra o CaMV-ES foram obtidos de coelhos brancos, da raça Nova Zelândia, com três meses de idade. Antes da primeira imunização, foi coletado sangue dos animais para preparação de soro normal.

Para o preparo do anti-soro foi obedecido o seguinte calendário: primeira injeção, por via coxim-plantar, com aplicação de aproximadamente 1,0 mg de vírus; após 10 dias, aproximadamente dois mg de vírus por via intramuscular; após 10 dias, como reforço, injeção intramuscular de aproximadamente um mg de vírus. As sangrias tiveram início seis dias após a terceira injeção.

O sangue coletado foi deixado coagular, a 37°C por uma hora, e a seguir a 4°C por 30 minutos. Os soros recolhidos foram centrifugados a 3000 g por 15 minutos, divididos em alíquotas de 2,5 ml e acondicionados em vidros de penicilina. O armazenamento foi feito em presença de glicerina 50% (v/v), a -20°C.

2.1.4. Determinação do Título dos Anti-Soros

O título de cada anti-soro foi determinado por meio do teste de microprecipitina. A diluição dos anti-soros foi

feita em tampão tris-HCl 0,05 M pH 7,3 contendo cloreto de sódio 0,85% (p/v), numa série de 1:2 a 1:2048.

Para o teste foram utilizadas placas de Petri revestidas com formvar, em solução a 0,1% em clorofórmio. Gotas de 20 μ l de cada diluição foram pipetadas por quadrículo, acrescentando-se em seguida igual volume de vírus purificado e diluído no mesmo tampão, na concentração de 0,1 mg/ml. As placas foram incubadas em banho-maria, a 37°C por uma hora. O título foi estimado com auxílio de lupa e a placa mantida contra fundo escuro. Como controle foi utilizado soro normal, nas diluições 1:2 e 1:16, no mesmo tampão.

2.2. Sensibilização com Látex

Para uso em testes sorológicos, a imunoglobulina produzida contra o CaMV-ES foi sensibilizada com látex, de acordo com método descrito por FRIBOURG e NAKASHIMA (1984).

Para a sensibilização, 0,5 ml de anti-soro, com título 1:256, foi diluído quatro vezes em solução salina (cloreto de sódio 0,85%, p/v), e então adicionou-se 2/3 do volume de solução saturada de sulfato de amônia, a fim de precipitar a fração globulina do anti-soro. A preparação obtida foi centrifugada a 7000 g por 20 minutos, e o sedimento foi ressuspenso em 2,0 ml de solução salina. Foi realizada diálise contra salina a fim de remover traços de sulfato de amônia. Procedeu-se então a diluição em série da fração globulina, em tubos recobertos com formvar (0,1%, p/v, em clorofórmio), obtendo-se soluções diluídas

desde 1:4 até 1:1024, em tris-HCl 0,05 M pH 7,2. A essas soluções foi adicionado igual volume de látex (Sigma Latex Beads, diluído 60 vezes em água destilada). As soluções foram mantidas em repouso, à temperatura ambiente, por 45 minutos, com agitação periódica, e a seguir centrifugadas a 13000 g por 10 minutos. Os sedimentos foram ressuspensos em 1,5 ml de tris-HCl 0,05 M pH 7,2, contendo polivinilpirrolidona a 0,02% (p/v) e azida de sódio a 0,05% (p/v). A centrifugação foi realizada por mais duas vezes, sendo por fim ressuspensos os sedimentos em 1,0 ml do mesmo tampão. Essa preparação, consistindo no anti-soro sensibilizado, foi mantida a 4°C.

A fim de constatar as diluições ideais da fração globulina do anti-soro, 20 µl de cada diluição foram depositados sobre placas de poliestireno (Falcon Integrid Petri Dishes, 10x10 cm, 36 quadrículos) e misturados a 20 µl de vírus purificado, em diluições 1:2 e 1:10 em água destilada. A placa foi mantida sob agitação por uma hora em agitador orbital. Avaliaram-se visualmente as diluições que proporcionaram a melhor resposta.

2.3. Caracterização das Inclusões Citoplasmáticas

2.3.1. Purificação e Morfologia

As inclusões citoplasmáticas induzidas pelo CaMV-ES foram purificadas conforme método descrito por SHEPHERD *et alii* (1980). O vírus foi multiplicado em plantas de mostarda, conforme descrito no item 2.2 do Capítulo I. O

extrato foliar e as soluções foram mantidos a frio (dois a 10°C, em todas as etapas). Folhas apresentando sintomas, coletadas 25 dias após a inoculação, foram trituradas em liquidificador na presença de tampão tris-HCl 0,05 M pH 7,5, contendo glicerol a 15% (v/v), 2-mercaptoetanol 0,01 M e sulfito de sódio 0,01 M (tampão de extração), na proporção 1:1 (p/v). O extrato foi filtrado em gaze dupla previamente fervida em água por 10 minutos, transferido para tubos de 250 ml, e centrifugado em almofada de sacarose a 20% (p/v), a 3600 g por 20 minutos. Os sedimentos foram ressuspensos em tampão de extração, à razão de 50 ml de tampão para cada 100 ml de extrato inicial. Seguiu-se adição de Triton X-100 a 25% (v/v), 15 minutos de agitação lenta e nova centrifugação sobre almofada de sacarose, conforme descrito anteriormente. O tratamento com Triton X-100 foi repetido por duas vezes, a fim de remover traços de cloroplastos presentes na preparação. Ao fim do tratamento, o sedimento foi ressuspenso em tampão de extração, na razão de cinco ml de tampão para cada 100 g de folhas processadas. Essa preparação, contendo basicamente corpos de inclusão e grãos de amido, foi ultracentrifugada a 45000 g por 20 minutos em gradiente de sacarose 40-60%, formado pela sobreposição, respectivamente, de 1,0, 1,0, e 1,0 ml de solução de sacarose 60, 50 e 40% (p/v) em tampão de extração. A banda contendo os corpos de inclusão foi coletada com auxílio de seringa, evitando-se coletar o material que se depositara mais acima, no gradiente. O material coletado foi por fim centrifugado a 17500 g por 30 minutos, ressuspenso em cinco ml de tampão de extração e armazenado a -20°C.

A fim de proceder a caracterização morfológica, as inclusões purificadas foram observadas em microscópio ótico e eletrônico. Sobre uma lâmina de microscopia depositou-se uma gota de floxina a 1% e uma gota da preparação purificada, cobriu-se com lamínula e observou-se em aumentos de 40, 100 e 400x. Para observação em microscópio eletrônico de transmissão, fragmentos de folhas de couve-flor, com aproximadamente 1 mm^3 , foram fixados em aldeído glutárico e tetróxido de ósmio, desidratados e preenchidos com resina epóxi. Cortes ultrafinos (50 a 100 nm) foram realizados em ultramicrotomo Sorvall MT2-B, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados em microscópio Zeiss modelo EM109, a 50 kV. Formato e tamanho das inclusões foram observados.

2.3.2. Estimativa do Peso Molecular da Proteína-Matriz

A proteína formadora das inclusões foi separada por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE).

Para a eletroforese, a proteína foi preparada diluindo-se uma preparação purificada de inclusões uma, duas, quatro e oito vezes em tampão tris-HCl 0,06 M pH 6,7 contendo SDS a 2% (p/v), 2-mercaptoetanol a 10% (p/v), glicerol a 10% (v/v) e azul de bromofenol a 0,25% (p/v) e aquecendo-a em água fervente por cinco minutos.

Empregou-se o sistema descontínuo de eletroforese, sendo o gel concentrador a 4% de acrilamida, em tampão tris-HCl 0,44 M pH 6,8, e o gel separador a 10% de

acrilamida, em tampão tris-HCl 0,44 M pH 8,8. Tanto o gel concentrador quanto o gel separador continham SDS a 1% (p/v), uréia a 2 M, persulfato de amônia a 0,07% (p/v) e tetra-metiletlenodiamina (TEMED) a 0,04% (v/v). O gel foi montado em placa de 15 x 15 cm e um mm de espessura, com 15 cavidades para aplicação das amostras. A placa com o gel foi colocada na cuba de corrida, que continha o tampão tris-glicina 0,025 M pH 8,9, acrescido de SDS a 0,1% (p/v) e Na-EDTA a 0,001 M.

A eletroforese iniciou-se a 100 V, até que as amostras penetrassem no gel de separação. Aumentou-se então a voltagem para 200 V e a eletroforese prosseguiu até que a linha frontal do azul de bromofenol alcançasse um cm antes do fim do gel. Foi utilizada uma fonte Bio-Rad modelo 1420B. A corrida foi realizada a 4°C para evitar o superaquecimento do gel.

A coloração foi realizada com azul de Coomassie (100 mg em 100 ml de metanol/ác.acético/água, 45:10:45) por 15 horas, e a fixação com metanol/ác.acético/água 45:10:45. Para a estimativa dos pesos moleculares das proteínas presentes no gel foram utilizados padrões Bio-Rad, de baixo peso molecular (14-100 kD).

2.4. Caracterização das Proteínas Capsidiais

A composição do capsídeo do CaMV-ES foi determinada mediante eletroforese (SDS-PAGE) das proteínas presentes em uma preparação purificada do vírus.

A fim de extrair as proteínas capsidiais para a eletroforese, uma preparação purificada do CaMV foi diluída quatro vezes em tampão tris-HCl 0,06 M pH 6,7 contendo SDS a 2% (p/v), 2-mercaptoetanol a 10% (p/v), glicerol a 10% (v/v) e azul de bromofenol a 0,25% (p/v) e fervida por quatro minutos. Após a ebulição, foram preparadas, a partir da amostra 1:4, amostras diluídas 20, 40 e 80 vezes, no mesmo tampão.

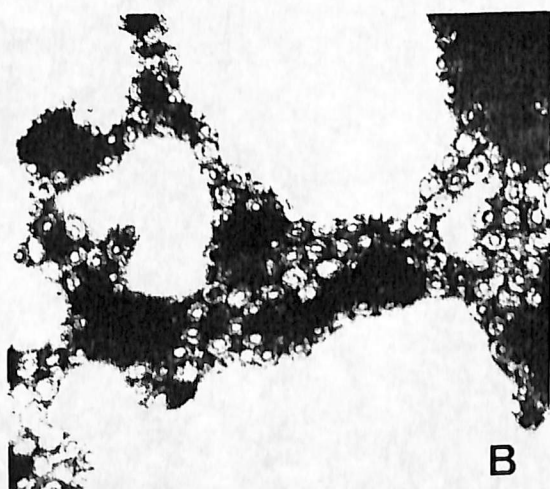
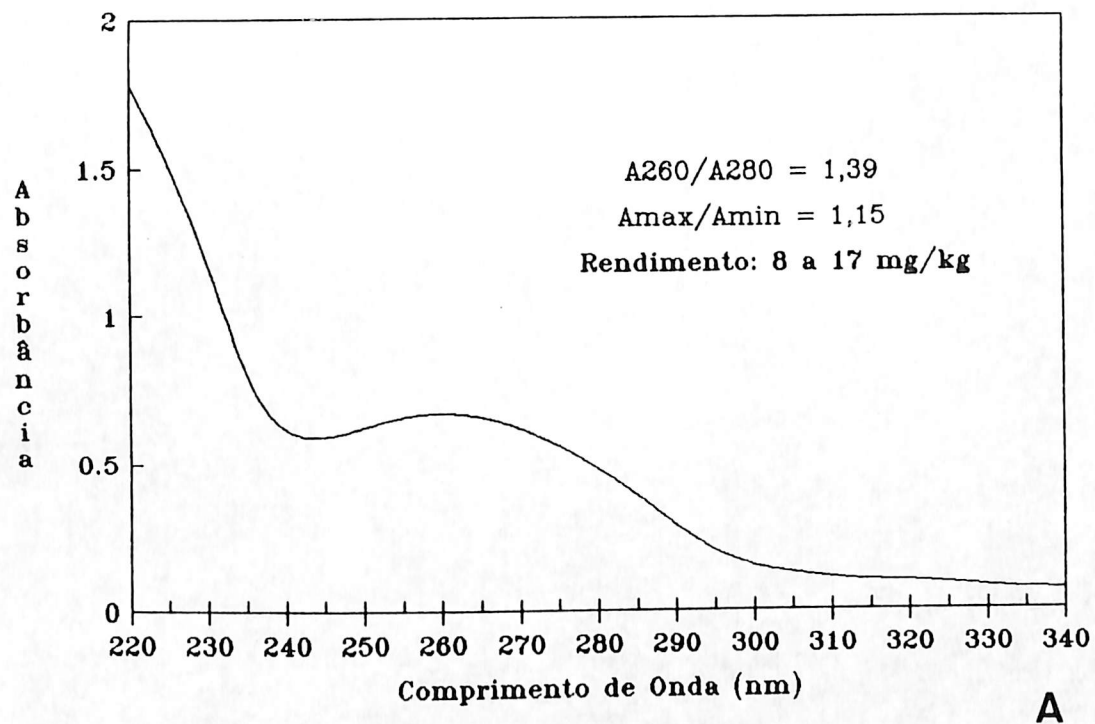
A eletroforese foi realizada nas mesmas condições descritas no item 2.3.2 deste capítulo, com a exceção do gel separador, que foi preparado em gradiente 10-18% de acrilamida.

3. RESULTADOS

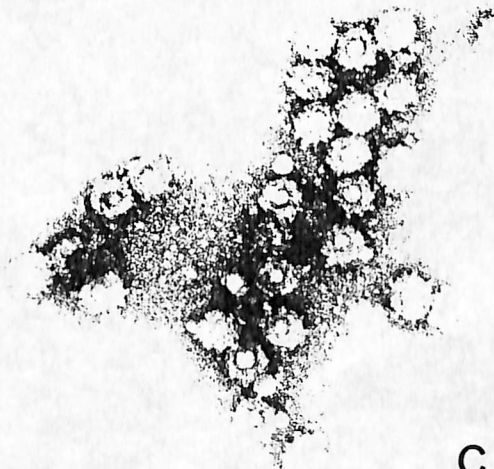
Foram realizadas doze purificações do CaMV-ES. Os rendimentos obtidos variaram de oito a 17 mg de vírus por kg de folhas processadas. Os valores de A_{\max}/A_{\min} e A_{280}/A_{260} (Figura 4A) , assim como eletrofotomicrografias das preparações purificadas (Figuras 4B e 4C), comprovaram a qualidade e pureza dessas preparações.

O anti-soro produzido contra o CaMV-ES apresentou um título máximo de 1:256 pelo teste de microprecipitina, considerado satisfatório para um vírus moderadamente imunogênico como o CaMV. O anti-soro não reagiu contra extrato foliar de plantas sadias nos testes sorológicos realizados. O IgG sensibilizado com látex reagiu satisfatoriamente com extrato foliar de plantas infectadas quando diluída a fração globulina de 1:64 a 1:256. As reações positivas (Figura 5) foram observadas em 30 minutos ou, no máximo, em uma hora.

A purificação das inclusões citoplasmáticas do CaMV-ES foi realizada com êxito. Observando-se as inclusões



B



C

FIGURA 4 - (A) Espectro de Absorção de Ultra-Violeta de uma Preparação Purificada do Vírus do CaMV-ES. (B) e (C) Eletromicrografias de uma Preparação Purificada do CaMV-ES Contrastada com Fosfotungstato de Potássio. (B) 50000 x e (C) 85000 x.

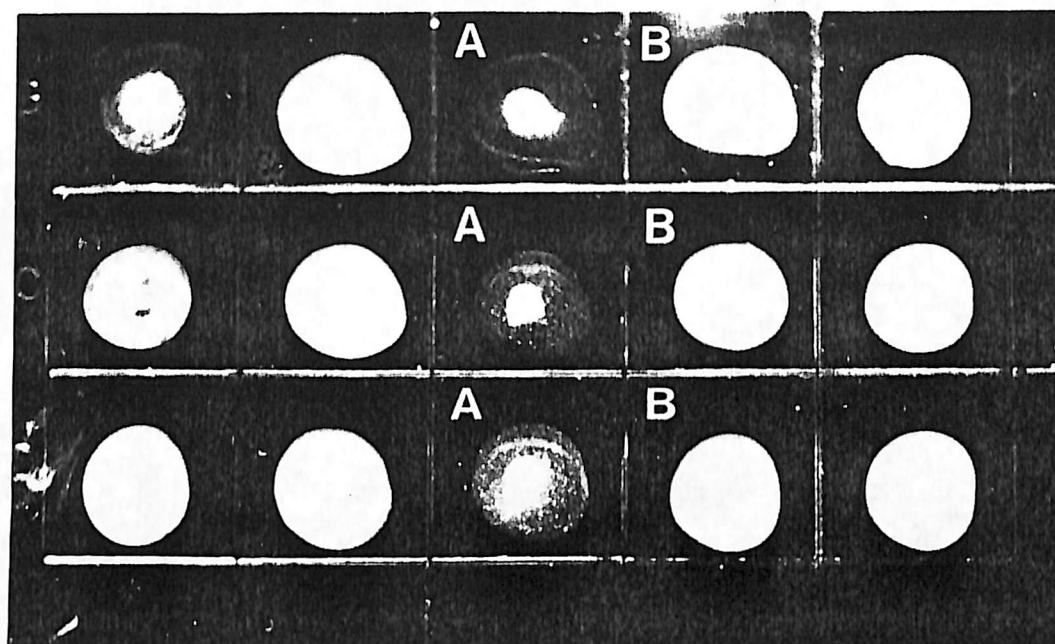


FIGURA 5 - Reações (A) Positiva e (B) Negativa para o Teste de Aglutinação em Látex entre IgG Purificado Obtido Contra o CaMV-ES e uma Preparação Purificada do Vírus.

ao microscópio ótico, verificou-se serem de formato ovóide ou ovóide-alongadas, algumas com arestas mais proeminentes, outras aproximadamente esféricas. O diâmetro médio estimado para as inclusões foi de 15,0 μm (Figuras 6A e 6B). A observação de inclusões ao microscópio eletrônico de transmissão permitiu constatar a presença de uma ou, no máximo, duas inclusões por célula. As inclusões não possuem membranas, e algumas contêm partículas virais em seu interior (Figuras 6C e 6D).

A pureza da preparação purificada de inclusões citoplasmáticas foi confirmada pela presença de apenas uma banda em gel de eletroforese (Figura 7A). O peso molecular estimado para a proteína-matriz foi de 41 kD (Figura 7B).

Várias bandas foram observadas após a eletroforese de preparações da proteína capsidial do CaMV-ES (Figura 8A). As bandas principais correspondem a polipeptídeos com pesos moleculares de 42, 37, 35 e 34 kD (Figura 8B). Outras bandas presentes em menor intensidade correspondem a polipeptídeos com 97, 78, 75, 41, e 19 kD (Figura 8B). Apenas quando as amostras foram diluídas quatro vezes no tampão foi possível observar com clareza todas as bandas. Foram preparados quatro géis, todos conduzindo aos citados pesos moleculares.

O método empregado para eletroforese revelou-se eficiente. O uso de gel em gradiente, entretanto, mostrou-se desnecessário, pois a resolução foi semelhante àquela obtida em um gel a 10% de poliacrilamida, utilizado preliminarmente para testar o método de extração das proteínas capsidiais.

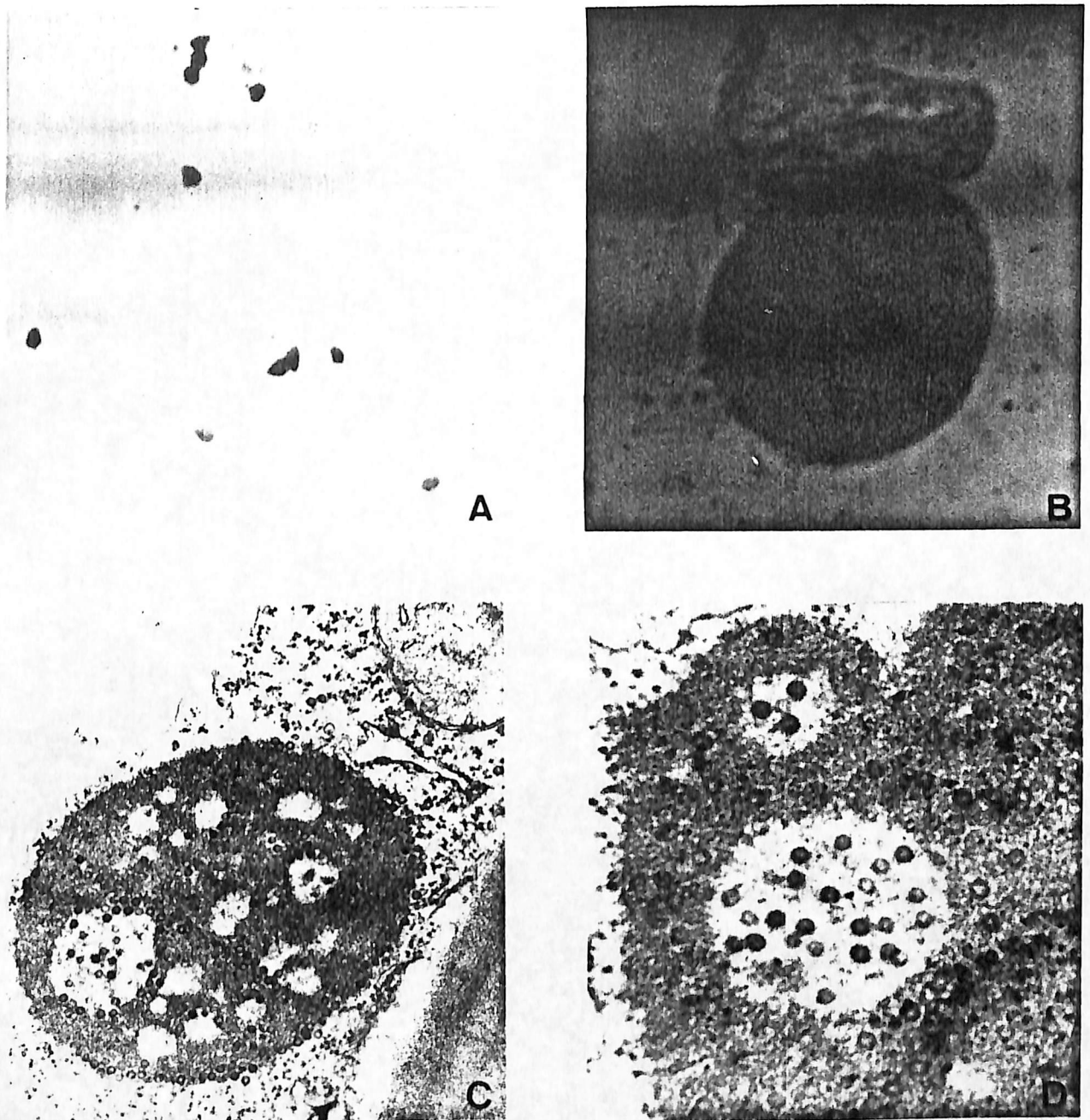
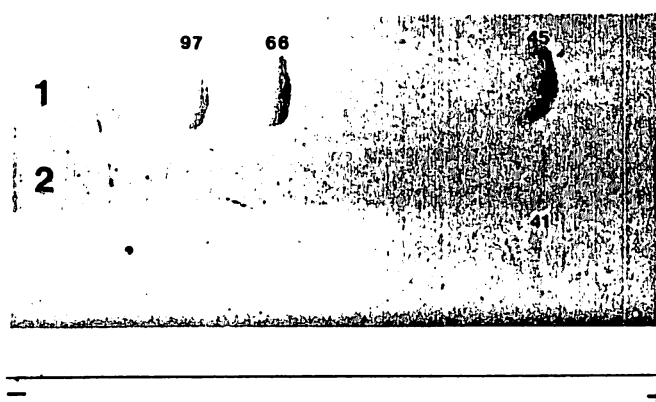
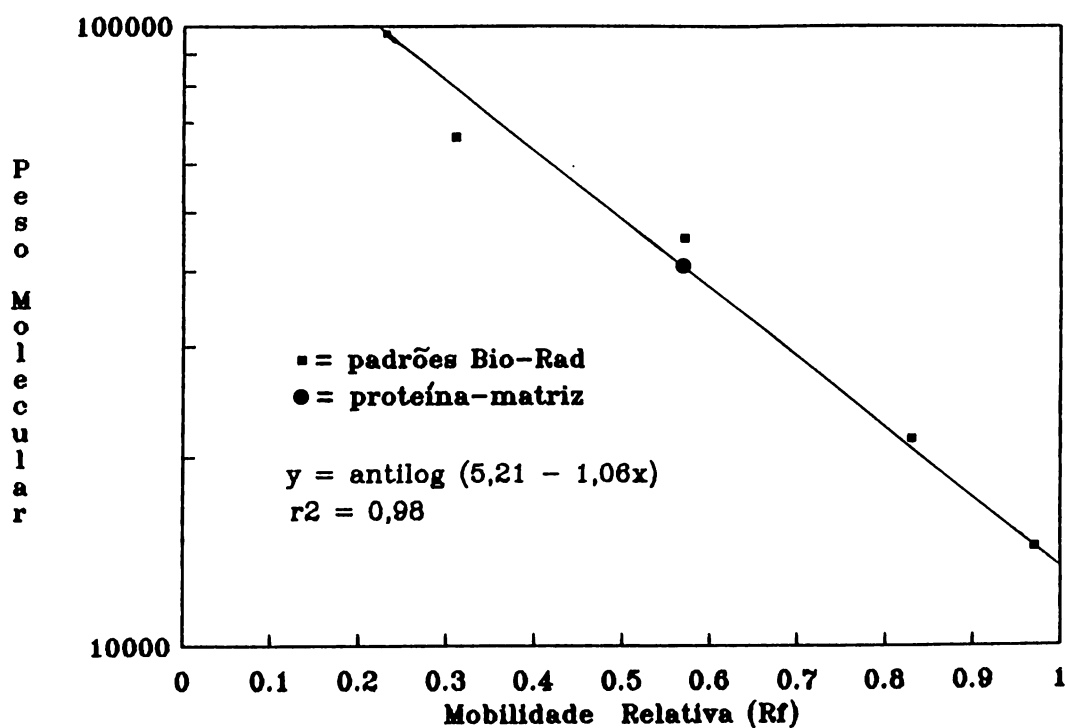


FIGURA 6 - (A) e (B) Preparação Purificada de Inclusões Citoplasmáticas Induzidas pelo CaMV-ES em Células Foliares de Plantas de Mostarda (*Brassica juncea*) Observada ao Microscópio Ótico. (A) 160x e (B) 1600x. (C) e (D) Eletromicrografias de Inclusões Citoplasmáticas Induzidas pelo CaMV-ES em Plantas de Couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). (C) 35000 x e (D) 50000 x.



A



B

FIGURA 7 - Padrões Eletroforéticos da Proteína-Matriz das Inclusões Citoplasmáticas do CaMV-ES. (A) SDS-PAGE 1. Padrões Bio-Rad 2. Proteína-Matriz das Inclusões. (B) Curva para Determinação do Peso Molecular da Proteína-Matriz.

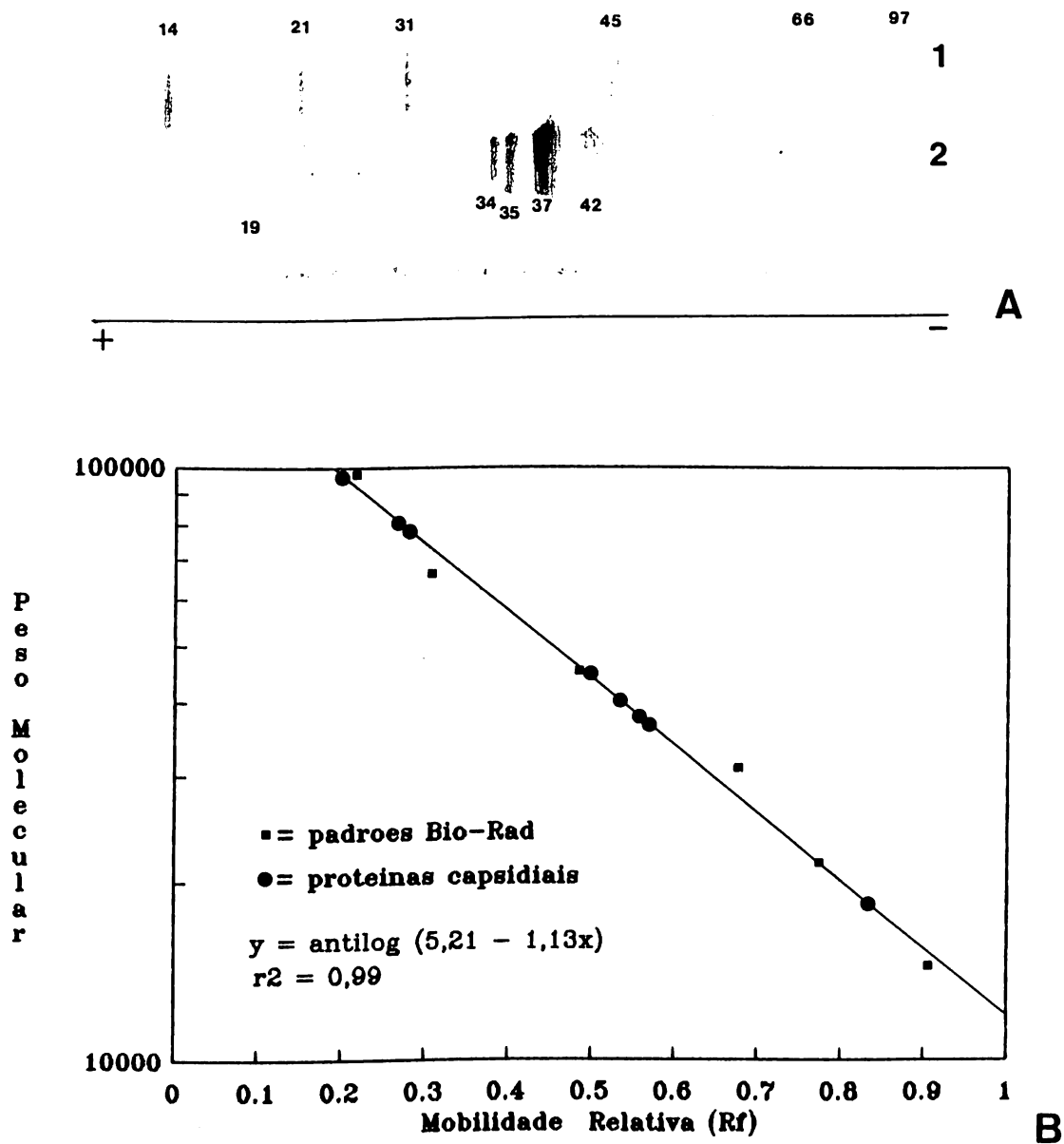


FIGURA 8 - Padrões Eletroforéticos das Proteínas Capsidiais do CaMV-ES. (A) SDS-PAGE 1. Padrões Bio-Rad 2. Proteínas Capsidiais. (B) Curva para Determinação dos Pesos Moleculares das Proteínas Capsidiais.

4. DISCUSSÃO

As inclusões citoplasmáticas induzidas pelo CaMV são os principais locais de acúmulo de partículas virais na célula infectada (SHOCKEY *et alii*, 1980). A fim de obter um elevado rendimento na purificação do vírus, é indispensável que as partículas sejam eficientemente liberadas das inclusões, caso contrário as inclusões serão sedimentadas na primeira centrifugação, causando a perda da quase totalidade de partículas virais presentes no extrato. Devido ao desconhecimento desse fato, as primeiras tentativas de purificação do CaMV levaram a um rendimento bastante baixo de vírus (PIRONE *et alii*, 1960 e 1961; SHEPHERD *et alii*, 1970).

A adição de uréia ao extrato viral imediatamente após a extração, seguida de incubação por uma noite, sob agitação, foi suficiente para desagregar as inclusões e liberar as partículas virais na solução, permitindo que uma primeira centrifugação sedimentasse partículas maiores sem perda significativa de vírus. Esse método, empregado pela

primeira vez para o CaMV por HULL *et alii* (1976), permitiu que os rendimentos obtidos neste trabalho fossem altamente satisfatórios, sendo semelhantes a rendimentos obtidos na purificação de potyvírus (DUSI, 1987). SHEPHERD (1981) relata que com algumas estirpes do CaMV, como CM4-184, as inclusões são rapidamente degradadas após a adição de uréia, não sendo necessário incubar o extrato por mais do que 15 minutos após a adição desse reagente. Alternativas nesse procedimento não foram testadas para o CaMV-ES.

Ao longo de todo o trabalho, plantas de mostarda foram empregadas como multiplicadoras do vírus, pois o CaMV-ES desencadeou sintomas externos nessas plantas com maior intensidade do que em couve-flor, conforme visto no Capítulo I. Ademais, a produção de massa foliar é significativamente maior em mostarda do que em couve-flor. Por fim, a purificação a partir da couve-flor pode implicar na possível presença de um outro vírus contaminante, com partículas alongadas, latente em couve-flor (NOGUEIRA e SILVA, 1985). Uma primeira purificação, realizada a partir de plantas de couve-flor enviadas diretamente do Espírito Santo, levou ao aparecimento desse contaminante, fato constatado por microscopia eletrônica.

O método empregado para a produção de anti-soro não deve ser responsabilizado pelo baixo título obtido. O CaMV é um vírus considerado moderadamente imunogênico (SHEPHERD, 1981), e a boa qualidade do anti-soro, característica mais importante, foi comprovada nos testes sorológicos.

É evidente que a sensibilização com látex pode auxiliar no aumento da eficiência de detecção viral. O teste

de látex provou ser eficiente para o caso do CaMV. A maior vantagem do teste é a facilidade com que reações positivas são distinguidas, além, é claro, da maior economia de anti-soro.

A presença de inclusões citoplasmáticas é uma das características típicas da infecção pelo CaMV e outros Caulimovírus. Em todos os estudos realizados neste trabalho, as inclusões citoplasmáticas do CaMV-ES mostraram-se muito semelhantes, morfológica e estruturalmente, àquelas produzidas por outros isolados do CaMV, bem como por outros Caulimovírus (BRUNT, 1971; SHALLA *et alii*, 1980).

Quando comparadas com outros isolados do CaMV, as inclusões do CaMV-ES assemelham-se àquelas induzidas por isolados mais virulentos, como Cabb B ou CM4-184. Isolados menos virulentos, como Bari, produzem normalmente inclusões de menor tamanho e com menor número de partículas virais (SHALLA *et alii*, 1980). É possível que em espécies nas quais o CaMV-ES se comporte de maneira menos agressiva as inclusões apresentem-se dessa forma. Os dois tipos de inclusões normalmente presentes (SHALLA *et alii*, 1980), vacuoladas contendo partículas virais e não-vacuoladas, compostas apenas pela proteína-matriz, também foram observadas em cortes ultrafinos realizados em células infectadas pelo CaMV-ES. Observou-se a ocorrência de uma ou, raramente, duas inclusões por célula.

A purificação das inclusões citoplasmáticas foi realizada sem o emprego do inibidor de proteases fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), utilizado por SHEPHERD *et alii*, 1980, a fim de evitar a degradação enzimática da

proteína-matriz das inclusões durante o processo. A ausência desse inibidor aparenta ser responsável pelo aspecto das inclusões nas preparações purificadas, com arestas mais proeminentes do que aquelas observadas nas inclusões ainda no interior de células infectadas. Da mesma forma, pode ser responsável pelo peso molecular estimado para a proteína-matriz após eletroforese (41 kD), significativamente menor que o valor de 55 kD, relatado na bibliografia. É pouco provável que essa banda corresponda à proteína capsidial, apesar da coincidência do peso molecular (41 e 42 kD), em razão da menor concentração da proteína capsidial em relação à proteína-matriz, nas inclusões (SHEPHERD, 1981).

A composição do capsídeo do CaMV foi durante muito tempo motivo de controvérsia. Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com a estrutura atualmente aceita para o capsídeo. As principais bandas obtidas no gel, correspondendo a proteínas de 42 e 37 kD, conferem precisamente com dados da bibliografia (SHEPHERD, 1981; HULL, 1984). Foi possível constatar a presença de dímeros da proteína de 37 kD (banda de 75 kD), bem como um polipeptídeo formado possivelmente pelas duas primeiras proteínas citadas, de 42 e 37 kD, em conjunto (banda de 78 kD). Nesses mesmos géis, bandas correspondentes a proteínas de menor peso molecular são provavelmente produtos da degradação das duas efetivas proteínas capsidiais. Diversos autores relatam a rápida degradação da proteína capsidial do CaMV após a purificação do vírus (TEZUKA e TANIGUCHI, 1972b; BRUNT *et alii*, 1975; HULL e SHEPHERD, 1976; AL-ANI *et alii*, 1979; HAHN e SHEPHERD, 1980).

5. RESUMO E CONCLUSÕES

O vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) foi purificado empregando-se plantas de mostarda (*B. juncea*) como multiplicadora. O método de purificação incluiu a extração em tampão de fosfato, adição de uréia e Triton X-100 e incubação do extrato foliar por 15 horas a 4°C, ultracentrifugação, ressuspensão dos "pellets" em tampão de fosfato e ultracentrifugação em gradiente de sacarose. Os rendimentos obtidos foram da ordem de 10 mg/kg. A qualidade da preparação purificada foi comprovada por espectrofotometria e microscopia eletrônica.

O anti-soro contra o CaMV foi produzido em coelhos, e o título obtido foi considerado satisfatório para um vírus moderadamente imunogênico como o CaMV. O IgG foi sensibilizado com látex, para o emprego no teste de aglutinação, por meio do qual se examinaram as espécies vegetais estudadas como possíveis hospedeiras do vírus.

As inclusões citoplasmáticas induzidas pelo CaMV em células infectadas foram purificadas mediante extração em

tampão de fosfato, três ciclos de centrifugação em almofada de sacarose e adição de Triton X-100 seguida de agitação por 25 minutos, finalizando com ultracentrifugação em gradiente de sacarose.

A proteína-matriz das inclusões citoplasmáticas e as proteínas capsidiais do vírus foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE). O peso molecular da proteína-matriz das inclusões foi estimado em 41 kD e das proteínas capsidiais em 42 e 37 kD.

CAPÍTULO III

CARACTERÍSTICAS DO ÁCIDO NUCLEICO DO CaMV-ES

1. INTRODUÇÃO

A grande maioria dos vírus de plantas possui o ácido ribonucleico (RNA), em cadeia simples (ssRNA), como o seu material genético (MATTHEWS, 1991; HIRTH, 1986). O grande interesse no uso do CaMV como vetor de expressão de genes em plantas advém de esse vírus possuir, como material genético, ácido desoxirribonucleico (DNA), em cadeia dupla (dsDNA), exatamente o mesmo tipo de ácido nucleico presente no genoma dos vegetais, o que facilita a manipulação do material genético em trabalhos de laboratório, com a incorporação de porções desse material genético em plantas. Dessa forma, grande atenção tem sido dispensada ao estudo do ácido nucleico do CaMV, atualmente um dos mais conhecidos, em estrutura e função, entre os vírus de plantas.

O peso molecular do ácido nucleico do CaMV é de aproximadamente 5×10^6 daltons, o que corresponde a uma molécula com aproximadamente 8000 pares de bases. A relação

molar G+C é de 43%. A temperatura de dissociação das fitas (T_m) é de 87,2°C e o comprimento linear do DNA é de 2,31 μ m (SHEPHERD *et alii*, 1970; RUSSEL *et alii*, 1971; SHEPHERD & WAKEMAN, 1971).

Preparações de DNA contêm normalmente moléculas lineares e circulares (SHEPHERD & WAKEMAN, 1971), cuja proporção varia de acordo com o tecido e o hospedeiro de multiplicação do vírus. As formas circulares não são completamente fechadas, mas possuem duas, três ou quatro "descontinuidades", pontos nos quais as extremidades de uma das fitas da cadeia dupla de DNA se sobrepõem, com o pareamento de bases e a formação de pequenos trechos de DNA de fita tripla. A localização dessas descontinuidades no DNA está bem definida e varia muito pouco entre os isolados e as estirpes do CaMV (VOLOVITCH *et alii*, 1978; OLSZEWSKI, *et alii*, 1982).

O genoma do vírus do mosaico da couve-flor contém seis "open reading frames" (ORFs, possíveis genes) efetivos (FRANCK *et alii*, 1980; GARDNER *et alii*, 1981), numerados de I a VI. ORF I provavelmente codifica a síntese de um "fator de movimentação célula-a-célula", que se acumularia nos espessamentos, induzidos pelo vírus, da parede celular de células infectadas, associados aos plasmodesmas (BASSI *et alii*, 1974; MARTINEZ-IZQUIERDO *et alii*, 1987; YOUNG *et alii*, 1987; LINSTED *et alii*, 1988). Com o ORF II é sintetizada uma proteína essencial à transmissão do vírus por afídeos e cujo peso molecular é de aprox. 18 kD (ARMOUR *et alii*, 1983). Alguns isolados do CaMV possuem uma deleção na molécula de DNA abrangendo toda a região correspondente ao

ORF II. Esses isolados não são transmitidos por afídeos (SHEPHERD, 1981). A proteína capsidial é sintetizada a partir do ORF IV (DAUBERT *et alii*, 1982). A enzima responsável pela síntese do DNA viral é codificada pelo ORF V (TOH *et alii*, 1983; TAKATSUJI *et alii*, 1986) e a proteína-matriz das inclusões citoplasmáticas é codificada pelo ORF VI (ODELL & HOWELL, 1980).

Alguns estudos sugerem que os ORFs II e VI são responsáveis por um fator determinante da gama de hospedeiras do vírus (SCHOELZ *et alii*, 1986a; SCHOELZ & SHEPHERD, 1988). A proteína codificada pelo ORF VI parece ter ainda outras funções, sendo por si só capaz de provocar sintomas da infecção pelo CaMV em plantas de fumo que não contêm o vírus. Seria assim a principal responsável pelo surgimento dos sintomas da doença, bem como pela severidade desses sintomas, embora de forma ainda não totalmente elucidada (BAUGHMAN *et alii*, 1988; PFEIFFER & HOHN, 1989). Essa proteína é a única codificada por um RNA monocistrônico (RNA 19S), ao passo que todas as outras proteínas codificadas pelo vírus provêm de um único RNA mensageiro policistrônico (RNA 35S) (ODELL *et alii*, 1981; PFEIFFER & HOHN, 1989).

FRANCK *et alii* (1980) e GARDNER *et alii* (1981) determinaram a seqüência completa de nucleotídeos de dois isolados do CaMV. Mapas de restrição de 33 isolados do CaMV foram elaborados por HULL (1980). Esse autor ressaltou a grande variabilidade nos mapas de restrição de diferentes isolados do vírus, refletindo o alto grau de recombinação e

mutação existente naturalmente no vírus do mosaico da couve-flor.

Com esta outra parte do trabalho, objetivou-se purificar o DNA do CaMV-ES e determinar o seu peso molecular. Submeteu-se o DNA à clivagem com algumas enzimas de restrição, com o objetivo de se determinar o número de sítios de restrição para cada enzima e o tamanho dos fragmentos gerados, e daí comparar os resultados com aqueles obtidos para outros isolados do vírus. Esse estudo foi a primeira etapa do mapeamento genético desse isolado do CaMV.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Purificação do DNA

O DNA do vírus do mosaico da couve-flor foi purificado segundo método descrito por SHEPHERD *et alii* (1970), com algumas modificações. Todas as soluções empregadas na purificação do DNA foram preparadas com água destilada, deionizada e autoclavada. A vidraria empregada foi previamente esterilizada a seco, a 150°C por três horas. Após o preparo, todas as soluções foram autoclavadas. Tubos de microcentrífuga e ponteiras de micropipetas, quando reutilizados, foram previamente fervidos em solução diluída de detergente por 20 minutos, enxaguados e em seguida autoclavados.

Ao vírus purificado foi adicionado 1/10 do volume de tampão citrato de sódio 0,1 M pH 7,0 contendo cloreto de sódio 0,5 M (10xSSC), SDS a 0,25% (p/v) e Pronase E, na forma de solução aquosa a 20 mg/ml, a fim de obter uma concentração final de enzima de 200 ug/ml. A solução de

Pronase foi previamente incubada a 37°C, por duas horas, a fim de eliminar traços de desoxirribonuclease (DNase) contaminante. Essa preparação foi mantida a 37°C por duas horas. A concentração de SDS foi então aumentada para 1,0% (p/v) e a incubação mantida por mais uma hora, à mesma temperatura.

O DNA foi extraído pela adição de fenol/clorofórmio a 50%. Adicionado o fenol, a preparação foi agitada por 30 segundos em vórtex e imediatamente centrifugada a 10.000 g por 15 minutos em microcentrífuga Eppendorf. A fase aquosa foi recolhida e submetida novamente ao tratamento com fenol/clorofórmio, nas mesmas condições. Seguiu-se a adição de 2,5 vols. de etanol absoluto e 0,05 vol. de acetato de sódio 3 M pH 5,5, a fim de precipitar o DNA. A preparação foi mantida a -20°C por uma hora e a seguir centrifugada a 10.000 g por 30 minutos. Ao sedimento foi adicionado 1 ml de etanol 70%, seguindo-se a centrifugação imediata a 10.000 g por cinco minutos, sendo ressuspensão o sedimento em tris-HCl 0,01 M pH 8,0 contendo EDTA 0,001 M (TE). O DNA foi mantido a -20°C após a purificação.

O DNA purificado foi inicialmente submetido à eletroforese em gel de agarose com o objetivo de comprovar a sua pureza. O gel consistiu de agarose (Merck nº 12017, para eletroforese) a 0,9% (p/v), dissolvida em tris-borato 0,089 M pH 8,0 contendo EDTA 2mM (TBE). O sistema empregado foi o "mini-gel". Sobre uma placa de 7x4 cm com sete cavidades foram vertidos 13 ml de agarose. Após a solidificação do gel, este foi transferido para a cuba de eletroforese. TBE foi utilizado como tampão de corrida. Cada

cavidade do gel continha um total de 7 μ l de material, sendo 2 μ l de corante (tris-HCl 0,01 M pH 8,0 contendo azul de bromofenol a 0,25% p/v, glicerol a 50% v/v e Na-EDTA 0,1 mM), 1, 2, 3 e 4 μ l de DNA e 4, 3, 2, e 1 μ l de TE, respectivamente. A eletroforese foi realizada a 100V/25mA, à temperatura ambiente, até que a linha frontal do azul de bromofenol atingisse 1,5 cm do fim do gel. Foi utilizada uma fonte Zenith modelo SP-2717A.

O gel foi corado com brometo de etídio a 5 μ g/ml, observado sob luz ultravioleta (Fotodyne Incorporated, 320 nm) e fotografado em câmara Polaroid modelo 500A, utilizando filme Polaroid P&B instantâneo, modelo 57, de 3000 ASA.

2.2. Estimativa do Peso Molecular

O peso molecular do DNA do CaMV-ES foi estimado mediante eletroforese em gel de agarose.

O preparo do gel e as condições de eletroforese foram os mesmos descritos no item 2.1 deste Capítulo. As cavidades foram preenchidas com (1) 5 μ l de DNA intacto mais 2 μ l de corante e (2) 1 μ l de padrão de peso molecular ("1 kb ladder", Bethesda Research Lab., U.S.A.) mais 2 μ l de corante e 4 μ l de água bidestilada.

2.3. Clivagem do Acido Nucleico com Enzimas de Restrição

A caracterização do DNA do CaMV-ES foi iniciada com a sua clivagem, em separado, com quatro enzimas de restrição: Eco RI, Bam HI, Bgl II e Pvu II. A partir dos

padrões de clivagem obtidos, determinou-se o número de sítios de restrição para essas enzimas. Os resultados obtidos foram comparados com aqueles obtidos para outros isolados do CaMV (MEAGHER *et alii*, 1977; HULL & HOWELL, 1978; HULL, 1980).

As reações de clivagem consistiram de (1) 5 µl de DNA, (2) 1 µl de enzima, (3) 1 µl do tampão de reação e (4) 3 µl de água tridestilada. Para Eco RI, Bam HI e Bgl II, o tampão de reação empregado foi tris-HCl 0,05 M pH 8,0, contendo cloreto de magnésio 0,01 M e cloreto de sódio 0,1 M. Para Pvu II, o tampão empregado foi tris-HCl 0,05 M pH 8,0, contendo cloreto de magnésio 0,01 M e cloreto de sódio 0,05 M. As reações com Bam HI, Bgl II e Pvu II foram mantidas a 37°C, por três horas, para que se completassem as clivagens. A reação com Eco RI foi mantida a 37°C por 30 minutos, para a clivagem parcial, e a 37°C por duas horas, para a clivagem total.

O número de fragmentos gerados foi determinado nas eletroforeses em gel de agarose. O preparo do gel e as condições de eletroforese foram os mesmos descritos no item 2.1 deste Capítulo. As cavidades foram preenchidas com (1) 5 µl da reação mais 2 µl de corante e (2) 1 µl de padrão de peso molecular mais 2 µl de corante e 4 µl de água bidestilada. A coloração dos géis foi realizada conforme descrito no item 2.1 deste Capítulo. O peso molecular dos fragmentos foi determinado com o auxílio do programa KBCALC, desenvolvido pelo Centro de Biotecnologia da UFRGS.

RESULTADOS

A purificação do ácido nucleico do CaMV-ES foi realizada seis vezes. Uma primeira purificação, realizada sem que se submetesse a enzima Pronase a pré-tratamento, levou à intensa degradação do DNA, conforme pode ser visualizado na Figura 9A. Corrigido esse problema, foi possível obter preparações altamente puras (Figura 9B). As purificações posteriores conduziram, eventualmente, ao surgimento de três bandas, que devem corresponder às formas linear, circular e "knotted" (nodosa) da molécula, mas sempre esteve presente uma banda correspondendo a uma molécula de DNA com aproximadamente 8000 pares de bases.

A clivagem do DNA com Eco RI levou ao surgimento de quatro fragmentos, com 2,4, 2,0, 1,7 e 1,4 kb (Figura 10A). A clivagem parcial com essa enzima levou ao surgimento de 10 fragmentos, com 8,0, 6,1, 5,5, 4,5, 3,5, 3,1, 2,6, 2,0, 1,8, e 1,6 kb (Figura 10B). Elaborou-se um mapa com os sítios de restrição do CaMV-ES para a enzima Eco RI (Figura 11). As

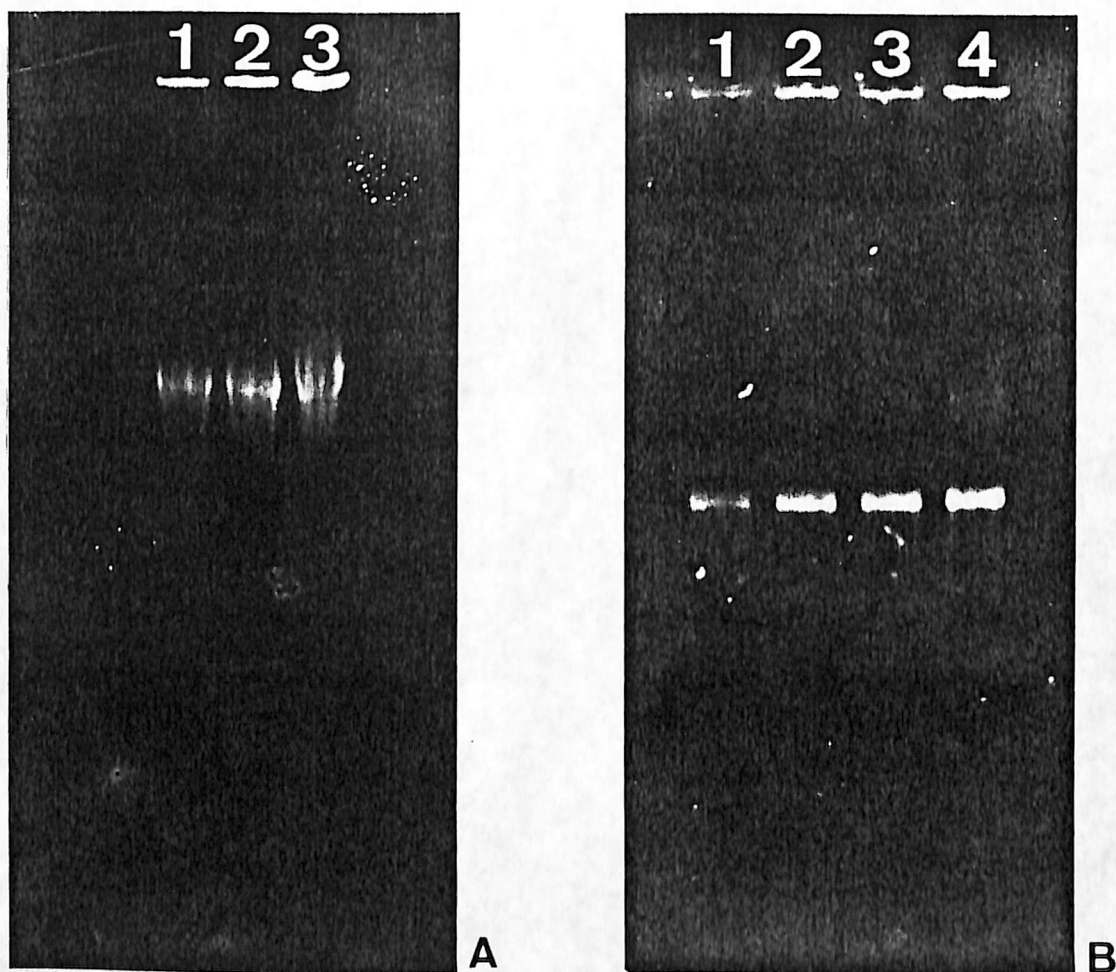


FIGURA 9 - (A) Bandas Correspondentes ao DNA do CaMV-ES, em Gel de Agarose 0,9%, Depois da Purificação do DNA Sem Pré-Incubação da Enzima Pronase. (1, 2 e 3. DNA do CaMV-ES). (B) Bandas Correspondentes ao DNA do CaMV-ES, em Gel de Agarose 0,9%, Depois da Purificação do DNA com Pré-Incubação da Enzima Pronase a 37°C por duas horas (1, 2, 3 e 4. DNA do CaMV-ES).

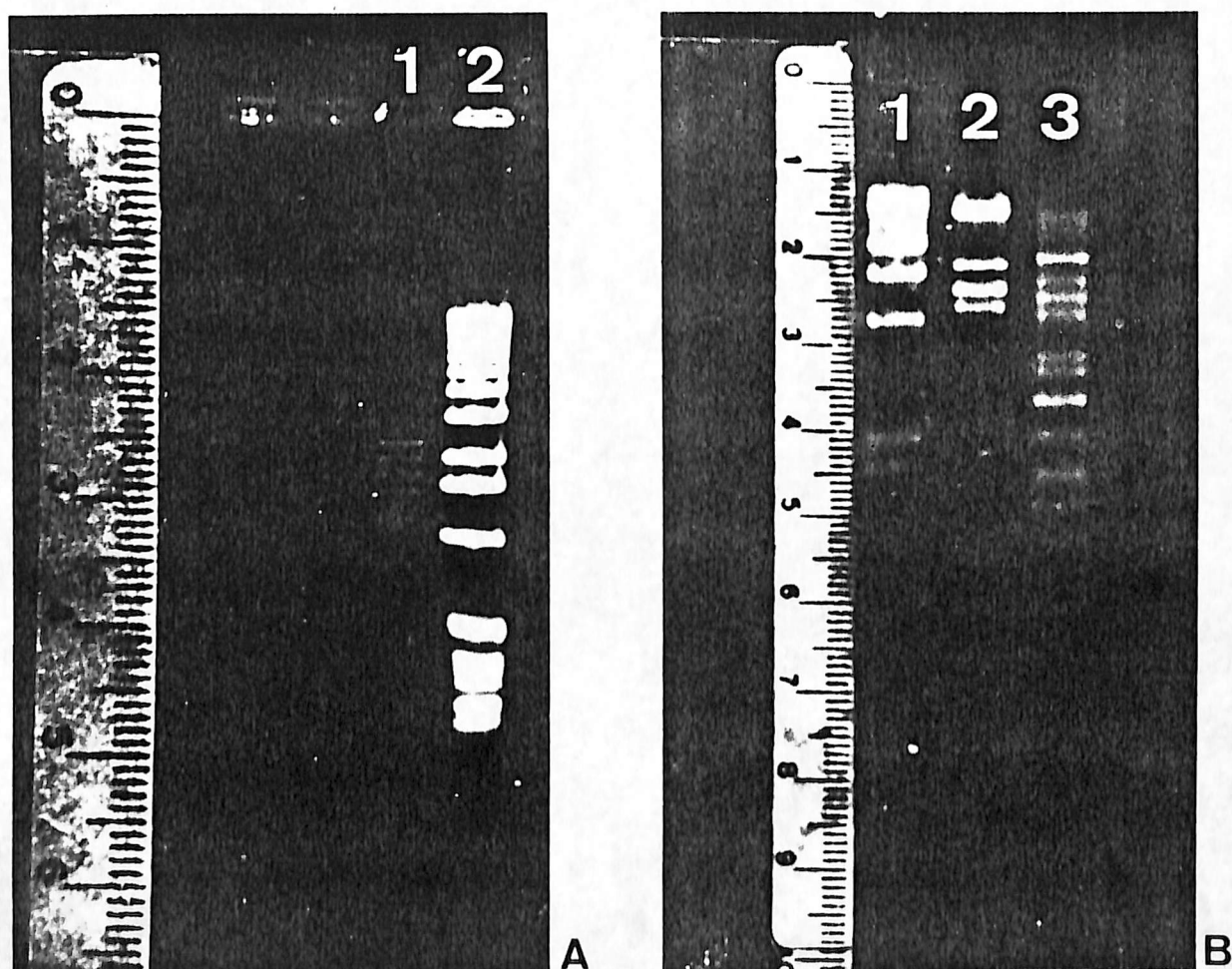


FIGURA 10 - Bandas Correspondentes a Fragmentos do DNA do CaMV-ES, em Gel de Agarose 0,9%, Depois de (A) Clivagem Total e (B) Clivagem Parcial do DNA com a Enzima Eco RI. A: 1. DNA do CaMV-ES, 2. "1 kb ladder". B: 1. DNA do Fago Lambda Clivado com a Enzima Hind III, 2. DNA do Fago Lambda Clivado com a Enzima Eco RI, 3. DNA do CaMV-ES Clivado com a Enzima Eco RI.

clivagens com as enzimas Bam HI, Bgl II e Pvu II levaram ao surgimento de, respectivamente, seis, cinco e cinco fragmentos (Figura 12). Os pesos moleculares dos fragmentos gerados para cada enzima podem ser verificados no Quadro 2.

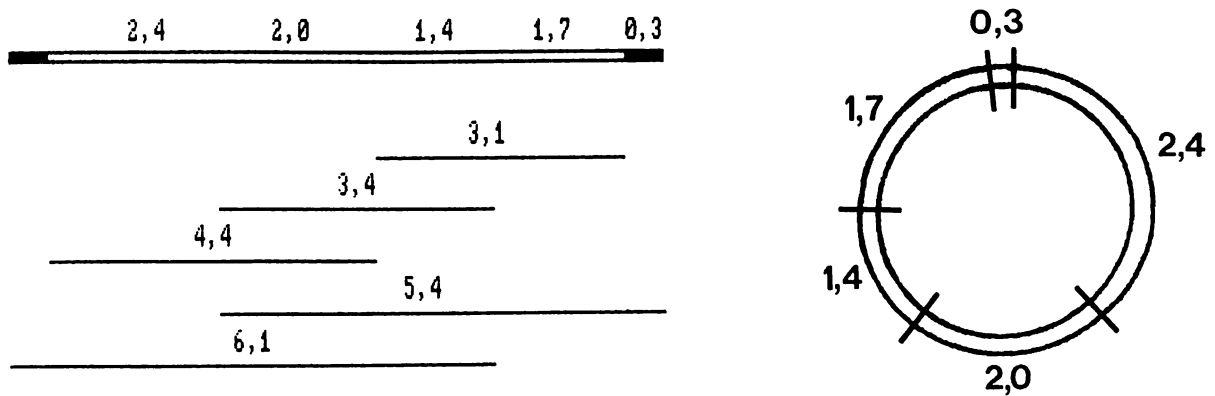


FIGURA 11 - Mapa de Restrição do DNA do CaMV-ES, para a Enzima Eco RI.

QUADRO 2 - Fragmentos Gerados Após Clivagem do DNA do CaMV-ES por Diferentes Enzimas de Restrição

Enzima	Fragmentos (kbp) ¹										
Eco RI	<i>8,0</i>	<i>6,1</i>	<i>5,5</i>	<i>4,5</i>	<i>3,5</i>	<i>3,1</i>	<i>2,6</i>	<i>2,0</i>	<i>1,8</i>	<i>1,6</i>	
Eco RI				<i>2,4</i>	<i>2,0</i>	<i>1,7</i>	<i>1,4</i>				
Bam HI				<i>4,9</i>	<i>3,1</i>	<i>2,7</i>	<i>2,2</i>				
Bgl II				<i>4,4</i>	<i>3,8</i>	<i>3,1</i>	<i>2,8</i>	<i>2,5</i>			
Pvu II				<i>4,9</i>	<i>3,1</i>	<i>2,7</i>	<i>2,2</i>				

1. Em itálico, fragmentos provenientes de digestão parcial; em negrito, fragmentos provenientes de digestão total.

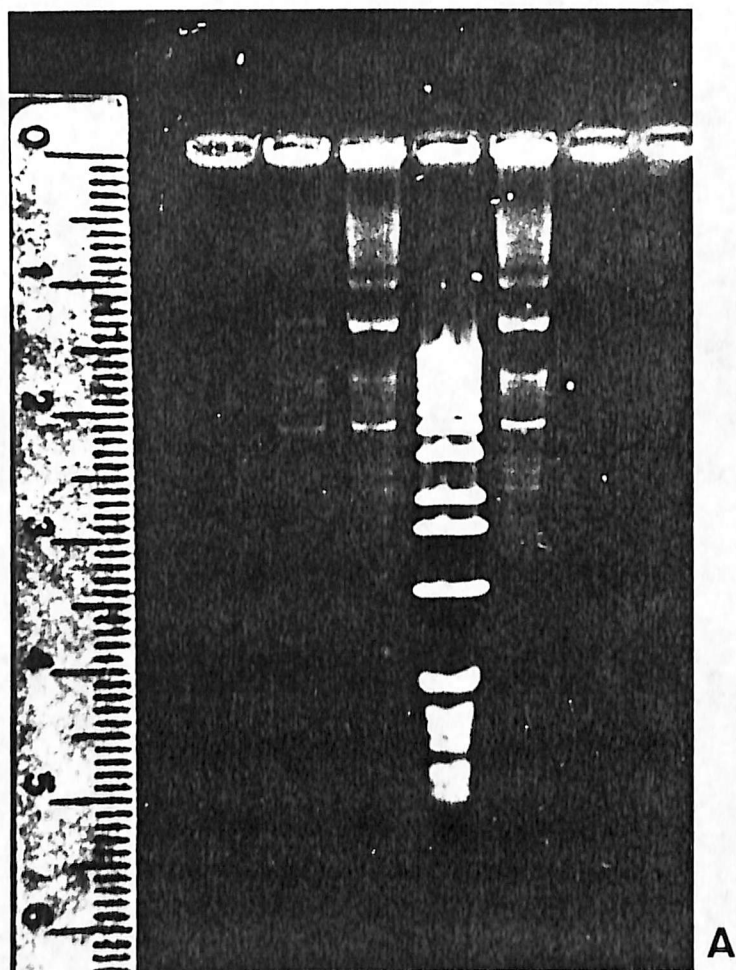


FIGURA 12 - (A) Bandas Correspondentes a Fragmentos do DNA do CaMV-ES, em Gel de Agarose 0,9%, Após Clivagem do DNA com as Enzimas Bam HI, Bgl II e Pvu II 1. DNA do CaMV-ES Clivado com Bgl II, 2. DNA do CaMV-ES Clivado com Bam HI, 3. "1 kb ladder", 4. DNA do CaMV-ES Clivado com Pvu II.

4. DISCUSSÃO

Ao longo de todo o processo de purificação do DNA, o principal objetivo foi a preservação da integridade das moléculas, ou seja, evitar ao máximo a sua degradação, tanto durante a purificação propriamente dita, como durante o armazenamento. Esse cuidado foi devido, basicamente, ao fato de não se trabalhar com o DNA clonado, mas sim com a molécula livre, durante os experimentos realizados após a purificação. Algumas etapas da purificação revelaram-se críticas para que tal objetivo pudesse ser alcançado.

A enzima empregada para a digestão do capsídeo viral, Pronase E, não é encontrada totalmente livre de contaminantes nas preparações comerciais. Esses contaminantes incluem DNases e RNases. Além de digerir o capsídeo, a preparação comercial de Pronase causava também a digestão, ainda que parcial, do ácido nucleico, que se mostrava bastante degradado no gel de agarose. A fim de evitar essa degradação, duas medidas poderiam ser adotadas: o uso de outra enzima, totalmente pura (p.ex., Proteinase K), não

disponível, ou a purificação da preparação comercial de Pronase. Essa purificação foi realizada com a pré-incubação da solução estoque de Pronase, a 37°C por duas horas, permitindo que a enzima, uma protease inespecífica que, dessa forma, atua sobre qualquer proteína, digerisse as próprias enzimas contaminantes presentes na preparação.

A purificação do DNA realizada após a pré-incubação de Pronase levou à obtenção de uma molécula íntegra, graças à ausência das enzimas contaminantes. Em gel de agarose, o DNA apresentava duas, ou às vezes três bandas, provavelmente correspondendo às formas linear, circular e "knotted" da molécula (MATTHEWS, 1991). Nas partículas virais, o DNA encontra-se na forma circular, mas durante o processo de purificação algumas moléculas podem se linearizar, e outras sofrer enovelamento, gerando respectivamente as formas linear e "knotted". Embora essas três formas apresentem o mesmo peso molecular, a conformação tridimensional de cada uma é distinta, sendo responsável pela diferente mobilidade de cada forma em géis de eletroforese. Assim, a forma linear move-se mais rapidamente, seguida pela forma circular e, por último, pela "knotted". A forma "knotted" consiste em moléculas circulares, apresentando vários graus de enovelamento. Conseqüentemente, suas conformações tridimensionais variam e, sob determinadas condições de realização da eletroforese, cada forma pode ser separada, formando uma banda distinta no gel (MATTHEWS, 1991). Neste trabalho, as condições da eletroforese não permitem a separação das formas "knotted", e possivelmente essas formas migraram como uma banda única. Essas observações estão de

acordo com os dados obtidos por MEAGHER *et alii* (1977), HULL e HOWELL (1978) e HULL e COVEY (1983).

Conquanto a pré-incubação de Pronase tenha permitido obter uma molécula de DNA íntegra ao final do processo de purificação, o grau de pureza dessas preparações ainda não permitia a clivagem com enzimas de restrição, possivelmente devido à qualidade da água utilizada para o preparo das soluções. A fim de obter um grau de pureza ainda maior, seria necessário reprecipitar o DNA, o que foi feito com acetato de amônia 7,5 M e etanol absoluto. O DNA reprecipitado foi centrifugado a 10000 g por 15 minutos, lavado com etanol 70%, centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos e finalmente ressuspensão em TE. Todas as soluções empregadas durante a reprecipitação do DNA foram preparadas com água bidestilada. Após a reprecipitação, o grau de pureza da preparação de DNA viral permitiu a atuação das enzimas de restrição sobre a molécula.

Um dos objetivos desta fase do trabalho era elaborar mapas de restrição para quatro enzimas (Eco RI, Bam HI, Bgl II e Pvu II). Entretanto, devido à limitada disponibilidade de enzimas, apenas o mapa para Eco RI pôde ser elaborado. Foram realizadas digestões com as outras três enzimas, mas os resultados não permitem a elaboração de um mapa. Esses resultados, de alguma forma, ainda podem ser comparados com aqueles obtidos por outros autores, com relação ao peso molecular dos fragmentos, a fim de estabelecer comparações entre o CaMV-ES e outros isolados do CaMV.

A clivagem do DNA do CaMV-ES com a enzima Eco RI levou a resultados semelhantes aos obtidos por HULL (1980)

para, e tão somente, os isolados do CaMV provenientes da Itália (Bari 2, Bari 3, Bari 4 e Milan), além de um único isolado proveniente da Inglaterra (CM 78-2). Esses isolados foram os únicos a gerarem os mesmos quatro fragmentos, além de um quinto fragmento de pequeno peso molecular, não detectado no CaMV-ES. A diferença entre os pesos moleculares determinados por HULL (1980) e por este trabalho está dentro do limite de erro da técnica empregada, de cerca de 10%.

Todos os outros isolados testados por HULL (1980), incluindo praticamente todas as regiões onde o CaMV já havia sido detectado na época, geraram apenas três fragmentos após clivagem do DNA com Eco RI.

As enzimas Bam HI, Bgl II e Pvu II clivaram parcialmente o DNA. O padrão obtido para Bam HI e Pvu II foi exatamente o mesmo. Ainda que alguns autores relatem que Bam HI sempre digere o DNA de forma parcial (HULL e HOWELL, 1978), os resultados obtidos não permitem comparações com aqueles obtidos por HULL (1980). As discrepâncias dos resultados podem ser atribuídas ao pequeno número de digestões realizadas com essas enzimas (duas para Bam HI, três para Bgl II e três para Pvu II). Especificamente, o fato de ter-se obtido o mesmo resultado para as duas enzimas gera dúvidas, pois a seqüência de reconhecimento de cada uma é bastante distinta, sendo pequena a probabilidade de haver o mesmo número de sítios, gerando fragmentos do mesmo tamanho, para ambas as enzimas. A possibilidade de contaminação não deve ser descartada. Um futuro desdobramento deste trabalho poderia conferir com precisão esses resultados.

A grande variação existente entre isolados do CaMV, com relação a sítios de enzimas de restrição, é fato comprovado por vários autores (HULL e HOWELL, 1978; HULL, 1980; SHEPHERD, 1981). HULL (1980) propôs 10 diferentes padrões de restrição para Eco RI. Esse autor testou 33 isolados do vírus, o que demonstra o grau de variação entre os isolados. Não lhe foi possível relacionar a variação dos mapas de restrição com características biológicas, como transmissão por afídeos ou sintomatologia, ou mesmo com a distribuição geográfica dos diferentes isolados. O autor sugere que novos isolados do vírus estariam surgindo freqüentemente, não havendo predominância de um ou poucos isolados sobre outros, no campo.

A falta de informações a respeito de outras características, biológicas, estruturais ou físico-químicas, dos isolados do CaMV provenientes da Itália, não permite estabelecer outras relações entre esses isolados e o CaMV-ES, além dos sítios de restrição para Eco RI. A possibilidade de relacionamento entre o CaMV-ES e esses isolados, de qualquer forma, pode ser inferida em vista da consistência dos resultados obtidos com Eco RI.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

O DNA do CaMV-ES foi purificado por meio de digestão do capsídeo viral com Pronase E (pré-incubada por duas horas a 37°C), desnaturação e remoção de proteínas com fenol/clorofórmio, precipitação do DNA com etanol absoluto, centrifugação e ressuspensão do DNA em tampão tris-borato. O DNA purificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose, verificando-se possuir aproximadamente 8000 pares de bases.

O estudo dos fragmentos obtidos após clivagem do DNA com Eco RI relaciona o CaMV-ES com isolados do CaMV provenientes da Itália. Os resultados obtidos após clivagem do DNA com Bam HI, Bgl II e Pvu II são insuficientes para permitir maiores considerações acerca do relacionamento do CaMV-ES com outros isolados do CaMV, embora indiquem ser distante o relacionamento com a estirpe típica do vírus (Cabb B-JI).

BIBLIOGRAFIA

- AL-ANI, R.; PFEIFFER, P.; LEBEURIER, G. The structure of Cauliflower Mosaic Virus II. Identity and location of the viral polipeptides. *Virology*, 93:188-97, 1979
- ARMOUR, S.L.; MELCHER, U.; PIRONE, T.P.; LYTTLE, D.J.; ESSENBERG, R.C. Helper component of aphid transmission encoded by region II of Cauliflower Mosaic Virus DNA. *Virology*, 129:25-30, 1983
- BASSI, M.; FAVALI, M.A.; CONTI, G.G. Cell wall protrusions induced by Cauliflower Mosaic Virus in chinese cabagge leaves: a cytochemical and autoradiographic study. *Virology*, 60:353-8, 1974
- BATTRAW, M.J. & HALL, T.C. Histochemical analysis of CaMV 35S promoter-B-glucuronidase gene expression in transgenic rice plants. *Plant Molecular Biology*, 15:527-38, 1990
- BAUGHMAN, G.A.; JACOBS, J.D.; HOWELL, S.H. Cauliflower Mosaic Virus gene VI produces a symptomatic phenotype in transgenic tobacco plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 85:733-7, 1988
- BEACHY, R.N.; LOESCH-FRIES, S.; TUMER, N.E. Coat protein-mediated resistance against virus infection. *Annual Review of Phytopathology*, 28:451-74, 1990
- BENFEY, P.N. & CHUA, N.-H. The Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. *Science, USA*, 250:959-66, 1990
- BRUNT, A.A. Some hosts and properties of dahlia mosaic virus. *Annals of Applied Biology*, 67:357-68, 1971

- BRUNT, A.A.; BARTON, R.J.; TREMAINE, J.H.; STACE-SMITH, R. The composition of Cauliflower Mosaic Virus protein. *Journal of General Virology*, 27:101-6, 1975
- CHALFANT, R.B. & CHAPMAN, R.K. Transmission of Cabbage viruses A and B by the cabbage aphid and the green peach aphid. *Journal of Economycal Entomology*, 55:584-90, 1962
- CLARK, G.W.; REGISTER III, J.C.; NEJIDAT, A.; EICHHOLTZ, D.A.; SANDERS, P.R.; FRALEY, R.T.; BEACHY, R.N. Tissue-specific expression of the TMV coat protein in transgenic tobacco plants affects the level of coat protein-mediated virus protection. *Virology*, 179:640-7, 1990
- CONTI, G.G.; VEGETTI, G.; BASSI, M.; FAVALI, M.A. Some ultrastructural and cytochemical observations on chinese cabbage leaves infected with Cauliflower Mosaic Virus. *Virology*, 47:694-700, 1972
- COOKE, R. & PENON, P. *In vitro* transcription from CaMV promoters by a cell-free extract from tobacco cells. *Plant Molecular Biology*, 14:391-405, 1990
- CUPERTINO, F.P.; KITAJIMA, E.W.; COSTA, C.L. Mosaico da couve-flor em brócolos, no Distrito Federal. *Fitopatologia Brasileira*, 11:394, 1986 (Resumo)
- DAUBERT, S. & ROUTH, G. Point mutations in Cauliflower Mosaic Virus gene VI confer host-specific symptom changes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 3:341-5, 1990
- DAUBERT, S.; RICHINS, R.; SHEPHERD, R.J.; GARDNER, R.C. Mapping of the coat protein gene of Cauliflower Mosaic Virus by its expression in a prokariotic system. *Virology*, 122:444-9, 1982
- DUSI, A.N. *Detecção Comparativa do Vírus do Mosaico Comum do Feijoeiro em Hipocótilos Mediante Dois Testes Sorológicos*. Viçosa, UFV, 1987. 72 p. (Tese M.S.)
- FRANCK, A.; GUILLEY, H.; JONARD, G.; RICHARDS, K.; HIRTH, L. Nucleotide sequence of Cauliflower Mosaic Virus DNA. *Cell*, 21:285-94, 1980
- FRIBOURG, C.F. & NAKASHIMA, J. An improved latex agglutination test for the routine detection of potato viruses. *Potato Research*, 27:237-49, 1984
- FUJISAWA, I.; RUBIO-HUERTOS, M.; MATSUI, C.; YAMAGUCHI, A. Intracellular appearance of Cauliflower Mosaic Virus particles. *Phytopathology*, 57:1130-2, 1967
- GARDNER, R.C.; HOWARTH, A.J.; HAHN, P.; BROWN-LUEDI, M.; SHEPHERD, R.J.; MESSING, J. The complete nucleotide sequence of an infectious clone of Cauliflower Mosaic Virus by M13 mp7 shotgun cloning. *Nucleic Acids Research*, 9:2871-88, 1981

- GRIERSON, D. & COVEY, S.N. *Plant molecular biology*. 2.ed. London, Blackie, 1988. 233p.
- GRONENBORN, B.; GARDNER, R.C.; SHEPHERD, R.J.; SCHAEFER, S. Propagation of foreign DNA in plants using Cauliflower Mosaic Virus as a vector. *Nature, UK*, 294:773-6, 1981
- HAHN, P. & SHEPHERD, R.J. Phosphorylated proteins in Cauliflower Mosaic Virus. *Virology*, 107:295-7, 1980
- HARRISON, B.D.; FINCH, J.T.; GIBBS, A.J.; HOLLINGS, M.; SHEPHERD, R.J.; VALENTA, V.; WETTER, C. Sixteen groups of plant viruses. *Virology*, 45:356-63, 1971
- HIRTH, L. The molecular biology of caulimoviruses. *Microbiological Sciences*, 3:260-5, 1986
- HOWELL, S.H.; WALKER, L.L.; DUDLEY, R.K. Cloned Cauliflower Mosaic Virus DNA infects turnips (*Brassica rapa*). *Science, USA*, 208:1265-7, 1980
- HULL, R. Structure of the Cauliflower Mosaic Virus genome. III. Restriction endonuclease mapping of 33 isolates. *Virology*, 100:76-90, 1980
- HULL, R. Caulimovirus Group. In: *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses n. 295*. CMI, 1984. 4 p.
- HULL, R. & COVEY, S.N. Characterization of Cauliflower Mosaic Virus DNA forms isolated from infected turnip leaves. *Nucleic Acids Research*, 11:1181-95, 1983
- HULL, R. & HOWELL, S.H. Structure of the Cauliflower Mosaic Virus genome. II. Variation in DNA structure and sequence between isolates. *Virology*, 86:482-93, 1978
- HULL, R. & SHEPHERD, R.J. The coat protein of Cauliflower Mosaic Virus. *Virology*, 70:217-20, 1976
- HULL, R.; SHEPHERD, R.J.; HARVEY, J.D. Cauliflower mosaic virus: an improved purification procedure and some properties of the virus particles. *Journal of General Virology*, 31:93-100, 1976
- KERLAN, C. & MEVEL, S. Variabilité biologique du virus de la mosaïque du chou-fleur sur chou-fleur en Bretagne. *Agronomie*, 9:83-90, 1989
- KITAJIMA, E.W. & COSTA, A.S. Ocorrência de vírus esférico causando faixa amarela das nervuras da couve em São Paulo. *Bragantia*, 24:219-29, 1965
- KITAJIMA, E.W.; LAURITIS, J.A.; SWIFT, H. Fine structure of zinnia leaf tissues infected with dahlia mosaic virus. *Virology*, 39:240-9, 1969

- KRUSÉ, J.; TIMMINS, P.; WITZ, J. The spherically averaged structure of a DNA isometric plant virus: Cauliflower Mosaic Virus. *Virology*, 159:166-8, 1987
- LINSTEAD, P.J.; HILLS, G.J. PLASKITT, K.A.; WILSON, I.G.; HARKER, C.L.; MAULE, J. The subcellular location of the gene I product of Cauliflower Mosaic Virus is consistent with a function associated with virus spread, *Journal of General Virology*, 69:1809-18, 1988
- LUNG, M.C.Y. & PIRONE, T.P. *Datura stramonium*, a local lesion host for certain isolates of Cauliflower Mosaic Virus. *Phytopathology*, 62:1473-75, 1972
- LUNG, M.C.Y. & PIRONE, T.P. Studies on the reason for differential transmissibility of Cauliflower Mosaic Virus isolates by aphids. *Phytopathology*, 63:910-4, 1973
- MARTELLI, G.P. & CASTELLANO, M.A. Light and electron microscopy of the intracellular inclusions of cauliflower mosaic virus. *Journal of General Virology*, 13:133-40, 1971
- MARTINEZ-IZQUIERDO, J.A.; FUTTERER, J.; HOHN, T. Protein encoded by ORF I of Cauliflower Mosaic Virus is part of the viral inclusion body. *Virology*, 160:527-30, 1987
- MATTHEWS, R.E.F. *Plant virology*. 2.ed. New York, Academic Press, 1981. 897p.
- MATTHEWS, R.E.F. *Plant virology*,. 3.ed. New York, Academic Press, 1991. 835p.
- MEAGHER, R.B.; SHEPHERD, R.J.; BOYER, H.W. The structure of Cauliflower Mosaic Virus. I. A restriction endonuclease map of Cauliflower Mosaic Virus DNA. *Virology*, 80:362-75, 1977
- MEVEL, S. & KERLAN, C. Caractérisation biologique de différent isolats du virus de la mosaïque du chou fleur (CaMV). 1. Plantes hôtes: Solaneés *Agronomie*, 10:749-58, 1990
- NOGUEIRA, N.L. & SILVA, D.M. Incorporação de uridina ou timidina tritiadas em folhas de couve infectadas com um vírus latente da faixa amarela das nervuras. *Fitopatologia Brasileira*, 10:315, 1985 (Resumo)
- ODELL, J.T. & HOWELL, S.H. The identification, mapping and characterization of mRNA for P66, a Cauliflower Mosaic Virus-coded protein. *Virology*, 102:349-59, 1980
- ODELL, J.T.; DUDLEY, R.K.; HOWELL, S.H. Structure of the 19S RNA transcript encoded by the Cauliflower Mosaic Virus genome. *Virology*, 111:377-85, 1981

- OLSZEWSKY, N.; HAGEN, G.; GUILFOYLE, T.J. A transcriptionally active, covalently closed minichromosome of Cauliflower Mosaic Virus DNA isolated from infected turnip leaves. *Cell*, 29:395-402, 1982
- PFEIFFER, P. & HOHN, T. Cauliflower Mosaic Virus as a probe for studying gene expression in plants. *Physiologia Plantarum*, 77:625-32, 1989
- PIRONE, T.P.; POUND, G.S.; SHEPHERD, R.J. Purification and properties of Cauliflower Mosaic Virus. *Nature, UK*, 186:656-7, 1960
- PIRONE, T.P.; POUND, G.S.; SHEPHERD, R.J. Properties and serology of purified Cauliflower Mosaic Virus. *Phytopathology*, 51:541-6, 1961
- RUSSEL, G.J.; FOLLET, E.A.C.; SUBAK-SHARPE, J.H. HARRISON, B.D. The double-stranded DNA of Cauliflower Mosaic Virus. *Journal of General Virology*, 11:129-38, 1971
- SAUNDERS, K.; LUCY, A.P.; COVEY, S.N. Susceptibility of *Brassica* species to cauliflower mosaic virus infection is related to a specific stage in the virus multiplication cycle. *Journal of General Virology*, 71:1641-7, 1990
- SCHOELZ, J.E. & SHEPHERD, R.J. Host range control of Cauliflower Mosaic Virus. *Virology*, 162:30-7, 1988
- SCHOELZ, J.E.; SHEPHERD, R.J.; DAUBERT, S.D. Region II of Cauliflower Mosaic Virus encodes a host range determinant. *Molecular and Cellular Biology*, 6:2632-7, 1986a
- SCHOELZ, D.; SHEPHERD, R.J.; RICHINS, R.D. Properties of an unusual strain of Cauliflower Mosaic Virus. *Phytopathology*, 76:451-4, 1986b
- SHALLA, T.A.; SHEPHERD, R.J.; PETERSEN, L.J. Comparative cytology of nine isolates of Cauliflower Mosaic Virus. *Virology*, 102:381-8, 1980
- SHEPHERD, R.J. DNA viruses of higher plants. *Advances in Virus Research*, 20:305-39, 1979a
- SHEPHERD, R.J. DNA plant viruses. *Annual Review of Plant Physiology*, 30:405-23, 1979b
- SHEPHERD, R.J. Cauliflower mosaic virus. In: *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses n. 243* (n. 24 revised). CMI, 1981. 8 p.
- SHEPHERD, R.J. & WAKEMAN, R.J. Observation on the size and morphology of Cauliflower Mosaic Virus DNA. *Phytopathology*, 61:188-93, 1971

- SHEPHERD, R.J.; BRUENING, G.E.; WAKEMAN, R.J. Double-stranded DNA from Cauliflower Mosaic Virus. *Virology*, 41:339-47, 1970
- SHEPHERD, R.J.; RICHINS, R.; SHALLA, T.A. Isolation and properties of the inclusion bodies of Cauliflower Mosaic Virus. *Virology*, 102:389-400, 1980
- SHEPHERD, R.J.; WAKEMAN, R.J.; ROMANKO, R.R. DNA in Cauliflower Mosaic Virus. *Virology*, 36:150-2, 1968
- SHOCKEY, M.W.; GARDNER, JR., C.O.; MELCHER, U.; ESSENBERG, R.C. Polypeptides associated with inclusion bodies from leaves infected with Cauliflower Mosaic Virus. *Virology*, 105:575-81, 1980
- SZETO, W.W.; HAMER, D.H.; CARLSON, P.S. THOMAS JR., C.A. Cloning of Cauliflower Mosaic Virus DNA in *Escherichia coli*. *Science, USA*, 196:210-12, 1977
- TAKATSUJI, H.; HIROSHIKA, H.; FUKUSHI, T.; IKEDA, J.-E. Expression of Cauliflower Mosaic Virus reverse transcriptase in yeast. *Nature, UK*, 319:240-3, 1986
- TEZUKA, N. & TANIGUCHI, T. Structural proteins of Cauliflower Mosaic Virus. *Virology*, 48:297-9, 1972b
- TOH, H.; HAYASHIDA, H.; MIYATA, T. Sequence homology between retroviral reverse transcriptase and putative polymerases of hepatitis B virus and Cauliflower Mosaic Virus. *Nature, UK*, 305:827-9, 1983
- TOKESHI, H. & SALGADO, C.L. Doenças das crucíferas. In: GALLI, F. (Ed.) *Manual de Fitopatologia, vol II - Doenças das plantas cultivadas*. São Paulo, Ed. Agron. Ceres, 1980. pp. 236-50
- TOMPKINS, C.M. A transmissible mosaic disease of cauliflower. *Journal of Agricultural Research*, 55:33-46, 1937
- VOLOVITCH, M.; DRUGEON, G.; YOT, P. Studies on the single-stranded discontinuities of the Cauliflower Mosaic Virus genome. *Nucleic Acids Research*, 5:2913-25, 1978
- WALKER, J.C.; LEBEAU, F.; POUND, G.S. Viruses associated with cabbage mosaic. *Journal of Agricultural Research*, 70:379-404, 1945
- YAMAOKA, N.; MORITA, T.; FURUSAWA, I.; YAMAMOTO, M. Effect of temperature on the multiplication of Cauliflower Mosaic Virus. *Journal of General Virology*, 61:283-7, 1982
- YOUNG, M.J.; DAUBERT, S.D.; SHEPHERD, R.J. Gene I products of Cauliflower Mosaic Virus detected in extracts of infected tissue. *Virology*, 158:444-6, 1987